

鎮咳薬コデイン及びジヒドロコデインのUHPLC分離における テトラヒドロフラン (THF) の分離選択性改善効果

西 博 行

On the Effect of Tetrahydrofuran (THF) as an Organic Modifier in the Separation of
Codeine and Dihydrocodeine by UHPLC

Hiroyuki NISHI

Abstract

This paper describes separation of dihydrocodeine and codeine, both are used as cough medicines, by UHPLC with a core-shell particle C18 column. The difference of the two drug substances is a double bond at C7 and C8 in their structures. In the optimization of the mobile phase composition, tetrahydrofuran (THF) found to be essence for the separation. Typical organic modifiers used for the reversed-phase HPLC, i.e., methanol and acetonitrile were not successful for the separation. Further, core-shell type C18 columns showed much higher performance (1.5 times theoretical plate number) compared with the conventional C18 columns with totally porous type packing materials having the same column size (4.6 mm i.d., 15 cm) and the particle size (5 μ m). Sodium octane sulfonate was also useful as an ion-pairing reagent, in addition to sodium dodecyl sulfate. Finally the optimized conditions were successfully used for the purity testing of the drug formulations containing dihydrocodeine or codeine.

Keywords : Codeine, dihydrocodeine, UHPLC, tetrahydrofuran, selectivity

1. はじめに

コデイン (図1) は, 1832年M. Bobiquetが, Gregory法により, あへんからモルヒネ製造を行ったときに不純物として発見されたものである。1881年には, M.Grimauxがモルヒネをメチル化してコデインを得ている。あへん中のコデイン含量は1~5%程度であり, コデインは麻薬性の鎮痛薬, 麻薬性鎮咳薬, 麻薬性止瀉薬として分類される。なお, あへんは麻薬の一種であり, ケシの実から生産され, 約10%のモルヒネを含む。一方のジヒドロコデイン (図1) はコデインのC₇, C₈位を還元したもので, 1911年 A. Skita, H. H. Franckによって初めて合成された。1913年には A. Fraenkelにより咳止めとして紹介され, それ以降, わが国ではこの目的で広く用いられている。製法としては, コデインをパラジウム又は白金触媒により接触還元して, ジヒドロコデインを得る。鎮痛, 鎮咳作用はコデインより強い¹⁾。

平成23年4月より適用されている日局16（収載品1764）²⁾では、コデインは原薬（リン酸塩水和物）、散剤（1%及び10%）及び錠剤が、ジヒドロコデインは原薬（リン酸塩）と散剤（1%及び10%）が収載されている。これらの定量は、原薬では過塩素酸を用いる非水滴定であるが、散剤及び錠剤ではいずれも固定相にオクタデシルシリル化シリカゲル（C18）カラムを、移動相にラウリル硫酸ナトリウム（SDS）を使用する、ソープクロマトグラフィーと呼ばれる一種のイオンペアークロマトグラフィーが採用されている。また、移動相には、有機溶媒としてテトラヒドロフラン（THF）が用いられている。

一般的に、医薬品、特に製剤の定量には、その優れた分離選択性から液体クロマトグラフィー（HPLC）が汎用されており、実際に日局16の収載品目を調査³⁾したところ、およそ550品目にHPLC法が採用されていた。そのうち92%が逆相モードでの分析、84%がC18カラムを用いるものであった。一方、移動相に用いられる有機溶媒は、アセトニトリル（ACN）、メタノール（MeOH）、あるいはこれらの混液を用いるものがほとんどであった。その中で、特徴的な例として、アトロピン、アヘンアルカロイド（モルヒネ、コデイン、パパペリン、ノスカピンなど）、モルヒネ、それに今回検討したコデイン、ジヒドロコデインに対して、共通な移動相として、0.2% SDSを含むリン酸塩緩衝液（pH3.0）・THF混液（240：70）（THF22.6%）が用いられている。その他に、アテノロール、アトルバスタチン、セフメタゾール等のHPLC分析で、ACNあるいはMeOHに加える第2の有機溶媒としてTHFが用いられている。これらの例を合わせても、THFを採用している日局16収載品目は、HPLC分析のわずか4%程度であった。いずれも対象とする不純物あるいは類縁物質等との分離の改善のためにTHFが採用されているものと推測される。THFは、逆相HPLCの開発黎明期より、ACN、MeOHにつぐ溶媒として検討されていたが^{4,5)}、最近では、粘性や臭気等からあまり用いられなくなっている。しかし、表1に示したいくつかの物理化学的性質から分離選択性の改善に有効であると考えられる。生薬成分であるベルベリンとパルミチンの分離に優れていることは、既に一部報告した^{6,7)}。

表1 逆相HPLCに用いられる有機溶媒の物性*

Org. solvent	UV cutoff	Refractive index(25°C)	Boiling point (°C)	Viscosity (cP, 25°C)	σ	σ_a	σ_o	σ_s	σ_h
THF	212	1.405	66	0.46	9.1	7.6	4	3	0
Dioxane	215	1.420	101	1.2	9.8	7.8	4	3	0
ACN	190	1.341	82	0.34	11.8	6.5	8	2.5	0
Ethanol	210	1.359	78	1.08	11.2	6.8	4	5	5
MeOH	205	1.326	65	0.54	12.9	6.2	5	7.5	7.5
Water	—	1.333	100	0.89	21	6.3	大	大	大

*パラメーター類 (σ , σ_a , σ_o , σ_s 及び σ_h) については本文参照

近年、HPLC分野では、従来の汎用タイプのカラムに対し、粒子径の小さな（2～3 μm ）充てん剤カラムを用いるUHPLCが登場した⁸⁻¹¹⁾。我々のグループは、このUHPLC法に着目して、医薬品開発のスピードアップやハイスループットに対応すべく、さらに高い分離性能や分析時間の短縮を目的とした研究を行っている¹²⁻¹⁵⁾。本論文では、コアシェル型C18カラムを用いて、鎮

咳薬として用いられているコデインとジヒドロコデインの分離についてTHFの選択性改善効果を検討した。あわせて日局で採用されている、多波長検出器を用いて測定した各成分の紫外可視吸収スペクトルによる成分の確認法についても検討した。

2. 実験方法

2.1 試料

カラム性能の確認のために用いたパラベン類：パラオキシ安息香酸メチル（メチルパラベン）、パラオキシ安息香酸エチル（エチルパラベン）、パラオキシ安息香酸プロピル（プロピルパラベン）、パラオキシ安息香酸イソプロピル（イソプロピルパラベン）、パラオキシ安息香酸ブチル（ブチルパラベン）、 t_0 のマーカ物質としてのウラシルは、和光純薬から試薬特級あるいは分析用を購入した。移動相に用いた有機溶媒類、MeOH、ACN及びTHFは、同じく和光純薬からHPLC用を購入し、使用した。分離の対象としたコデイン（リン酸塩水和物）及びジヒドロコデイン（リン酸塩）ともに原薬は麻薬であるため、分離の検討には、それぞれの日本薬局方品の製剤の1%散剤を用いた。前者では、リン酸コデイン散1%「日医工」、リン酸コデイン散1%「フソー」、後者ではリン酸ジヒドロコデイン散1%「日医工」、リン酸ジヒドロコデイン散1%「フソー」を購入して用いた。図1にコデインリン酸塩水和物、ジヒドロコデインリン酸塩及びモルヒネの構造式を示す。

パラベン及びウラシルは、それぞれ100 mgを100 mLのメスフラスコにとり、メタノールを加えて溶かし、100 mLとして各原液とした。UHPLC用のパラベン混合液は、それぞれのパラベン及びウラシル原液、各々10 mLを100 mLのメスフラスコに正確にとり、水を加えて100 mLとし、試料溶液とした。1%散剤については、それぞれ1.0 gをとる、水50 mLを加えてよく振り混ぜて、そのまま試料溶液とした。



ケシの花とその果実（ケシ坊主）

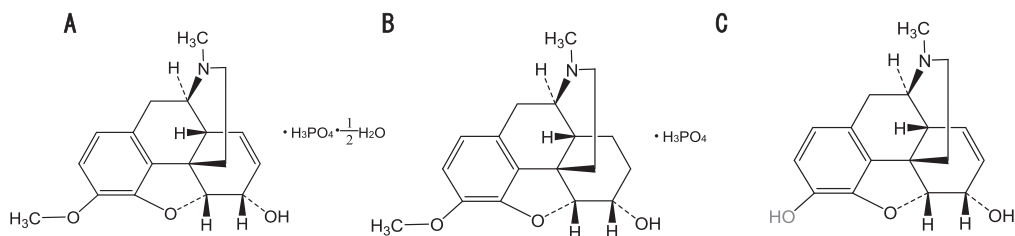


図1 A：コデインリン酸塩水和物，B：ジヒドロコデインリン酸塩及び，C：モルヒネの構造式

2.2 装置

HPLC装置として、(株)島津製作所(京都)のProminence装置一式(UHPLC対応)を使用した。ポンプはLC-20AB(耐圧上限40 MPa, 約400 kg/cm²), オートインジェクターとしてはSIL-20ACを, 検出器はSPD-M20A多波長検出器(photo diode array detector, PDA), システムコントローラはCBM-20A, カラムオープンはCTO-20Aを, また, デガッサー DGU-20A₃を使用した。なお, カラムから検出器までの配管は内径0.1 mmのステンレス管を用いたが, 検出器のセルは通常の容量10 μLのものを使用し, スリット幅は8 nm(他に1.2 nm選択可能)とした。PDAの時定数(レスポンス)及びサンプリングタイムは, 640 ms(初期設定値)から80 msに変更して用いた。

カラムは, コアシェル型のものとして, Sunshell C18 (2.6 μm, 4.6 mm i.d.×100 mm), Capcell Core C18 (2.7 μm, 4.6 mm i.d.×100 mm), Kinetex 2.6 μm C18 (2.6 μm, 4.6 mm i.d.×100 mm) 及びKinetex 5 μm C18 (5 μm, 4.6 mm i.d.×150 mm) を使用した。比較用の既存のカラムとして, Phenomenex Gemini NX5u C18 (5 μm, 4.6 mm i.d.×150 mm) を用いた。ピークの理論段数 N , 理論段高さ H 及び分離度 R_s は, Prominence装置に搭載されているデータ解析ソフトを用いて計算した。検出モニターはUV280 nmあるいは254 nm, カラム温度は40℃の一定温度とし, 流量は1 mL/minとした。なお, 移動相は, 薄めたリン酸あるいはリン酸塩緩衝液にSDSあるいはオクタンシルホン酸ナトリウムを添加したものに, 有機溶媒ACN, MeOHあるいはTHFを適宜混合し, メンブランフィルター(0.45 μm)でろ過して使用した。

3. 結果及び考察

3.1 コアシェル型C18カラムによる分析

UHPLC用の全多孔性充てん剤カラム(粒子径約2 μm, カラム長5 cm)を用いると, 従来カラム(粒子径5 μm, カラム長15 cm)で要したパラベン類の一斉分離に要した分析時間7.5分が, 三分の一の2.5分で達成されることは報告した¹²⁾。5 cmと短いカラムでカラム圧損が300 kg/cm²

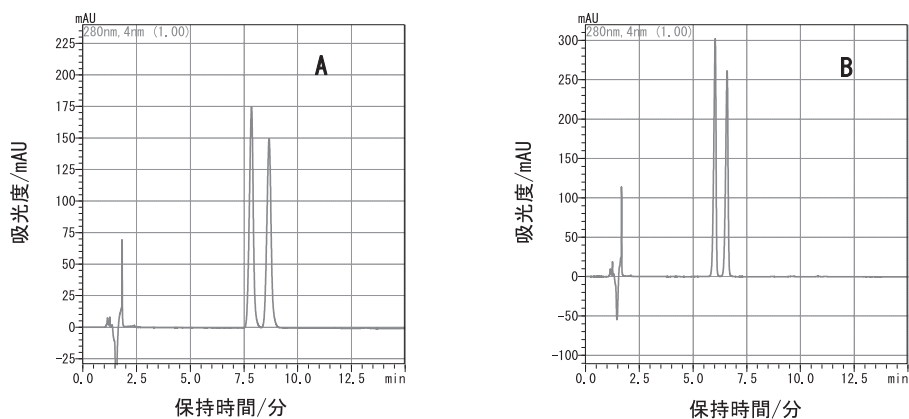


図2 日局16記載のHPLC条件によるコデインとジヒドロコデインの分離
 A: 既存カラム: Phenomenex Gemini-NX5u (5 μm, 4.6 mm×150 mm)
 B: コアシェル型カラムKinetex C18 (5 μm, 4.6 mm×150 mm)

と高かったため、コアシェル型カラムKinetex 2.6 μm C18 (4.6 mm i.d.×100 mm) を使用して、パラベン類の分離を検討したところ、MeOH60%、流量1.0 mL/min、40℃の条件で、近接して溶出する構造異性体イソプロピルパラベンとプロピルパラベンが上記と同じ2.5分程度で、 R_s 1.5 (完全分離)、 M 11800、カラム圧損約200 kg/cm²で達成された¹⁴⁾。

今回は、日局16のHPLC条件に従って、全多孔性の従来型C18カラムによる分離と、比較のためにこの従来型カラムのスペックと同じであるが、コアシェル型充填剤としたC18カラムを用いて、コデインとジヒドロコデインの分離を検討した。結果を図2に示す。ほぼ同じ保持時間で分離が達成されているが、前者での両ピークの R_s 、 N 及びカラム圧損が、それぞれ2.4、9400、99 kg/cm²であったのに対し、後者では、2.7、15400、103 kg/cm²と、後者のコアシェル型のほうが優れた、すなわち、カラム圧損は同じで、 N が1.5倍となる結果が得られた。また、現行の日局法の条件によりコデインとジヒドロコデインは、良好に分離されることが確認された。溶出順は、ジヒドロコデイン、コデインの順であった。

3.2 有機溶媒の分離選択性 (移動相の検討)

次に分析の高速化を目的に、粒子径2.6 μm 、カラム長10 cmのコアシェル型C18 カラムを用いて分離及び有機溶媒の分離選択性について検討した。移動相の緩衝液組成としては、日局16の0.2% SDSを含むリン酸塩緩衝液 (pH3.0) として、有機溶媒としては、ACN、MeOH及びTHFを用いた。Capcell Core C18 (2.7 μm 、4.6 mm i.d.×100 mm) カラムを用いた時の結果の一部を図3に示す。MeOH 50%を用いた場合は保持時間12分で分離せず ($R_s = 0$)、ACN 35% (図3B) においても R_s 1.4 (N 22200) であったのに対し、THF 22.5% (図3A) では保持時間が上記図2Bの既存スペックのコアシェル型 (5 μm 、4.6 mm i.d.×150 mm) と比較して、保持時間が二分の一の3.5分と短くなったにもかかわらず、 R_s 3.3 (N 19300) が得られた。また、カラム圧損は、189 kg/cm²であった。

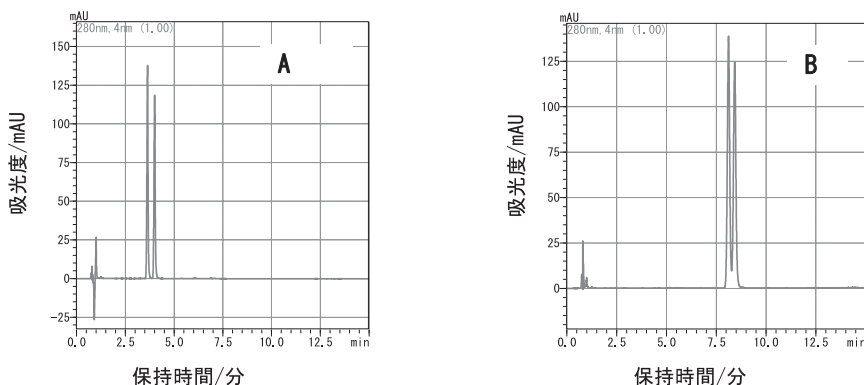


図3 コデインとジヒドロコデインの分離における有機溶媒の分離選択性
カラム：コアシェル型C18カラム (2.6 μm 、10 cm)
移動相：日局16の緩衝液に対してA：THF22.5% B：ACN35%

THFを含めた逆相HPLCに用いられる有機溶媒の幾つかの特性を表1にまとめたが、THFはHildebrandの溶解パラメーター (σ) が小さく、極性の弱い溶媒といえる。すなわち溶出力が

強い。分子間に働く相互作用を表す様々な溶解パラメーターのうち、THFは分散溶解パラメーター (σ_d) が大きく、ACNは双極子配向力に基づく配向溶解パラメーター (σ_o) が、MeOHは水素受容体 (σ_a) あるいは水素供与体溶解パラメーター (σ_h) が他と比較して大きな値となっている。分離における選択性の違いはこれらにより説明される。具体的に言えば、C18固定相部位であるオクタデカン ($C_{18}H_{38}$) は、MeOHには溶解しないが、THFには溶ける。この事実からHPLC固定相の状態は、MeOHを用いる場合は固まった状態で寝込んでいるのに対して、THFの場合は溶媒和されて立ち上がっているものと推定されている^{16,17)}。図4に模式図を示す。

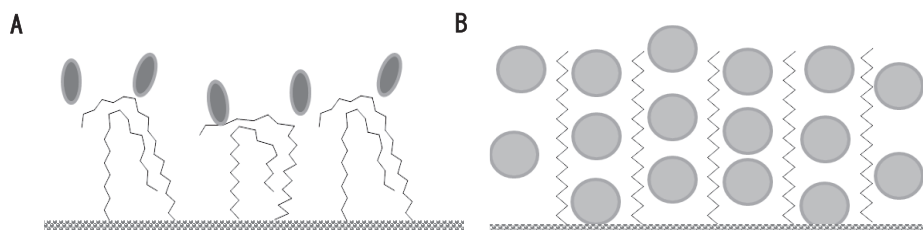


図4 C18カラムの表面の状況の推定模式図
A : MeOH移動相 (楕円 : MeOH) B : THF移動相 (○ : THF)

以上より、コデインとジヒドロコデインの分離には、THFは必須の有機溶媒であり、粒子径2.6 μm 、カラム長10 cmのコアシェル型C18カラムにより、コデイン類の迅速分離分析が低いカラム圧損で可能であることが分かった。なお、日本のレギュレーションでは、試験法に用いるHPLCカラムの充填剤粒子径の変更、例えば、現行の日局16の5 μm から2.6 μm とするには、規格及び試験法の一部変更申請（規格一変）が規制当局に対して必要であるため煩雑であるが、その場合は、既存スペックのコアシェル型（5 μm 、4.6 mm i.d. \times 150 mm）が利用できよう。なお、米国薬局方（USP: United States Pharmacopoeia）では、General chapter 621: Chromatographyに、許容される変更パラメータとその範囲が示されている¹⁸⁾。カラム長Lと粒子径dpに対しては、L/dpが-25% ~ +50%で可能となっており、現行15 cm/ 5 μm = 3であれば、2.6 μm の場合は5.9 ~ 11.7 cmのカラム長となる。7.5 cmあるいは今回用いた10 cmカラムは、変更なしで使用可となる。

最後に、移動相に用いられている緩衝液について検討を行った。薄めたリン酸（1 \rightarrow 1000）のみとした場合は、THF 2%で3.2分にきわめてテーリングの激しいピークが検出された。ピーク形状の改善には、イオンペア試薬は必要と判断され、SDSよりも鎖長の短いオクタンスルホン酸ナトリウムを検討した。その結果、THF16%で保持時間4分、 R_s 2.7 (N 17000) が得られ、オクタンスルホン酸ナトリウムでも良好に分離可能であることが分かった。また、SDSの場合に必要なとされる有機溶媒量（22.5%）よりも少なくてもよいことが分かった。

3.3 多波長検出器（PDA）による確認

医薬品の品質を保証する、いわゆる「規格及び試験方法」には、その品質および特性を評価するための試験項目が採用される。医薬品の「規格及び試験方法」の典型的な例は、日局収載医薬品の各条である。原薬では、性状、確認試験、純度試験、定量法などが、製剤では、これらに加えて、溶出試験や含量均一性試験が設定される¹⁹⁾。原薬及び製剤両者において、確認試験は必ず

設定しなければならない試験項目であり、一般的に原薬では赤外吸収スペクトル (IR) 法が製剤では紫外可視吸光度 (UV/VIS) 法がよく用いられている。

医薬品の純度試験や定量法には、ほとんどの場合、HPLC法による試験法が設定されているが、検出器としてPDAを用いると分離成分のUV/VISスペクトルを得ることができる。PDAによるUV/VISスペクトルを用いた成分確認が日局で使用可能となった²⁰⁾。そこで、図3Aの条件で取得したクロマトグラムにつき、PDAで得られたUV/VISスペクトルを図5に示す。両者でC₇、C₈位の二重結合があるかないかの違いであるので、類似のスペクトルを与えている。日局によるとジヒドロコデインの極大吸収波長 (λ_{max}) は 283 nm, コデインのλ_{max}は 285 nmとなっており、コデインのほうがわずかではあるが長波長側にλ_{max}がある。今回UHPLC/PDA装置で得られたジヒドロコデイン及びコデインのλ_{max}は、それぞれ 282 nmと 284 nmであり、これに対応し、それぞれを区別できること、また、吸収パターンよりこれら成分であることの確認も可能であることが分かった。

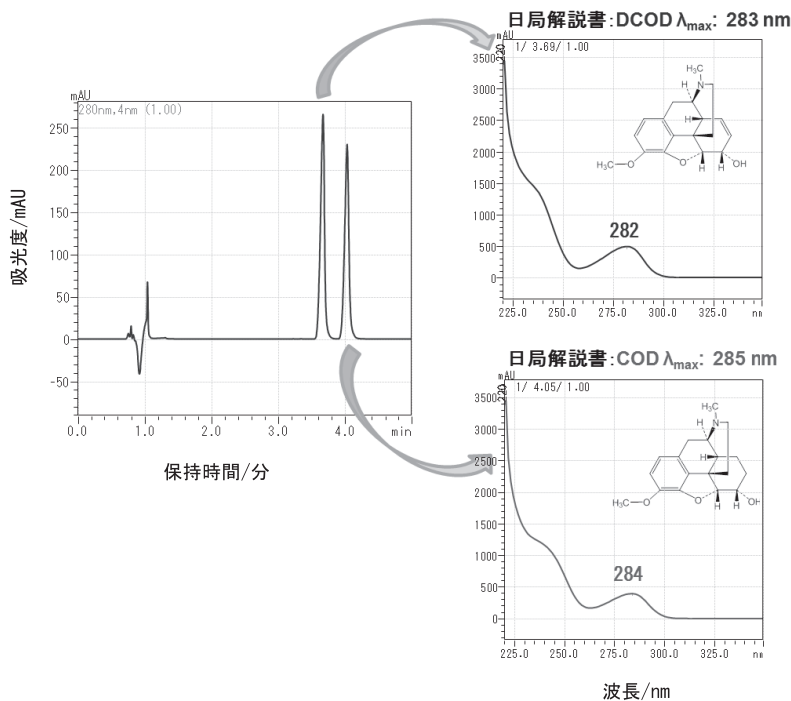


図5 多波長検出器 (PDA) を用いた成分確認 (確認試験)
UHPLC条件は図3Aと同じ。

3.4 純度試験法への応用

今回検討に用いた1%散剤につき、280 nm検出で純度試験を行った。試料は製剤1.0 g (有効成分10 mg含有) を50 mLの水に溶かし、そのまま試料溶液とした。ジヒドロコデイン1%散剤及びコデイン1%散剤から得られたクロマトグラムを図6に示す。乳糖水和物 (散剤の基剤) に

よると思われるフロントの大きな乱れの後にくつつかの微小な類縁物質ピークが検出された。特にジヒドロコデインでは、コデインの溶出位置に微小ピークが観測され、反応の残と推定された。また、両者いずれにおいても7.5分程度で純度試験が可能であると考えられた。

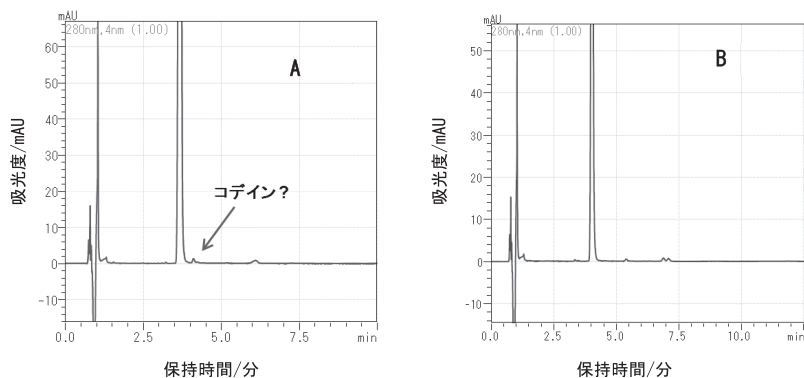


図6 A：ジヒドロコデイン散1%及びB：コデイン散1%の純度試験
UHPLC条件は図3Aと同じ。

4. ま と め

以上、ジヒドロコデインとコデインの分離には、有機溶媒としてTHFが分離選択性に優れ、必須であることが分かった。また、コデイン類のHPLC条件として、SDSに代えてオクタンシルホン酸ナトリウムを用いることでも良好なピーク形状が得られることが分かった。今回、コアシェル型のC18カラムを用いることで4分以内に迅速な純度試験が可能であること、また、PDAによるUV/VISスペクトルを用いることでこれら成分のより精度のよい確認も可能であることが分かった。

引 用 文 献

- 1) 第十六改正日本薬局方解説書, 廣川書店, (2011).
- 2) 日本薬局方第十六改正, じほう社, (2011).
- 3) 武田朋子, 河野早苗, 卒業研究調査報告(実験ノート), (2013).
- 4) L. R. Snyder and J. J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography 2nd edition, John Wiley & Sons, New York (1979).
- 5) A. M. Krstulovic and P. R. Brown, Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, New York (1982).
- 6) 武田朋子, 河野早苗, 西 博行, 日本薬学会第134年会(熊本), 要旨集No.2, p.277 (2014)
- 7) 永田智沙, 河野早苗, 武田朋子, 西 博行, 第25回クロマトグラフィー科学会議(25回記念大会, 京都), 要旨集p.36 (2014).
- 8) C. Sanchez, T. Farkas, *Am. Lab.*, 44, 11-14 (2012).
- 9) N. Nagase and T. Tsukamoto, *Chromatography*, 34 (1), 41-47 (2013).
- 10) E.L.Regalado, P. Zhuang, Y. Chen, A. A. Makorov, W. A. Schafer, N. McGachy, C. Welch, *Anal. Chem.*,

- 86 (1), 805-813 (2014).
- 11) S. Fekete, J. Schappler, J-L. Veuthey, D. Guillarme, *Trends in Anal. Chem.*, 63, 2-13 (2014).
 - 12) 永松久実, 西村基弘, 西 博行, *安田女子大学紀要*, 40巻, 403-411 (2012).
 - 13) H. Nishi and K. Nagamatsu, *Anal. Sci.*, vol.30, 205-211 (2014).
 - 14) 西 博行, 稲垣昌宣, *安田女子大学紀要*, 43巻, 367-376 (2015).
 - 15) 永田智沙, 篠原 舞, 森田志保美, 河野早苗, 武田朋子, 西 博行, 日本薬学会第135年会 (神戸), 要旨集No.2, p.277, 講演番号27PA-am066 (2015).
 - 16) F. Gritti and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, 77 (5), 4257-4272 (2005).
 - 17) 長江徳和, JASIS 2013新技術説明会資料 (2013).
 - 18) United States Pharmacopoeia 38- National Formulary 33, USP Convention (2014).
 - 19) 監修 レギュラトリーサイエンス学会, 医薬品製造販売指針2015, じほう社, (2015).
 - 20) 第十七改正日本薬局方原案作成要綱, JP Forum, vol.21, No.1, 27-69 (2012).

[2015. 6. 25 受理]