

ポピーシード中のモルヒネおよびコデイン分析法

岩 崎 由 美 子, 田 端 節 子, 飯 田 憲 司, 木 村 圭 介,
中 里 光 男, 広 門 雅 子, 井 部 明 広, 安 田 和 男

Determination of Morphine and Codeine in Poppy Seeds

Yumiko IWASAKI, Setsuko TABATA, Kenji IIDA, Keisuke KIMURA,
Mitsuo NAKAZATO, Masako HIROKADO, Akihiro IBE and Kazuo YASUDA

ポピーシード中のモルヒネおよびコデイン分析法

岩崎 由美子*, 田端 節子*, 飯田 憲司*, 木村 圭介*,
中里 光男**, 広門 雅子*, 井部 明広*, 安田 和男***

Determination of Morphine and Codeine in Poppy Seeds

Yumiko IWASAKI*, Setsuko TABATA*, Kenji IIDA*, Keisuke KIMURA*,
Mitsuo NAKAZATO**, Masako HIROKADO*, Akihiro IBE* and Kazuo YASUDA***

A method for determining morphine and codeine in poppy seeds was developed using HPLC. Morphine and codeine were extracted with 75% methanol and refined with an Oasis MCX cartridge. The LC separation was performed on the CAPCELL PAK C18 UG120 column using 0.1 mol/L ammonium formate (pH8.5) and acetonitrile as the mobile phase. Morphine and codeine were confirmed by LC/MS/MS. The average recovery rates of morphine and codeine from poppy seeds were 88% and 92%, respectively, with a variation coefficient of 3% and a quantification limit of 0.5 µg/g.

Keywords : モルヒネ morphine, コデイン codeine, ポピーシード poppy seed, 高速液体クロマトグラフィー HPLC, 液体クロマトグラフ/タンデム質量分析法 LC/MS/MS

はじめに

ポピーシード（けしの種子）(Fig.1.B)は *Papaver somniferum* L.の完熟した種子で、ケシの果実(Fig.1.A)の中に約1万粒が入っている。ポピーシードは脂肪やタンパク質に富み、製菓原料、食用油など食品として利用されている。

現在日本では、ケシ（けし、あへん、けしがら）は、アヘン法で栽培、所持等が規制されている。ケシにはモルヒネ、コデイン (Fig. 2) などのアヘンアルカロイドが含まれるが、種子については含まれないと考えられているため、規制から除外されている。

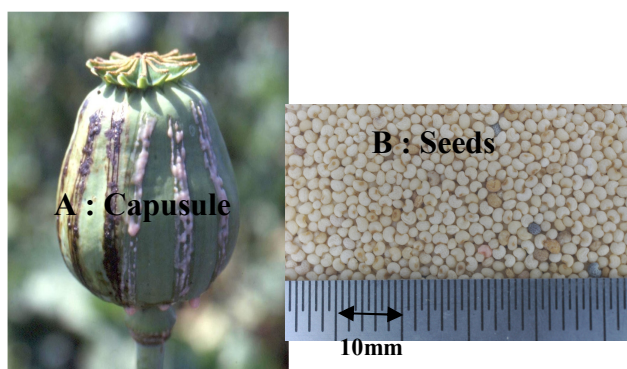


Fig. 1. Poppy Capsule (A) and Poppy Seeds (B)

しかし、近年ヨーロッパではポピーシードからのモルヒネの検出が多数報告されている¹⁾。モルヒネは主に激しい

疼痛の緩和に使用される。副作用としては吐き気、嘔吐、呼吸抑制、心拍への影響があり、連用すると肉体的精神的依存が生じる。治療最少経口用量は1.9 mgである。この用量以上のモルヒネを含むポピーシードを摂取した場合に有害作用を起こす可能性がある。ドイツ連邦リスクアセスメント研究所 (BfR : Bundesinstitut für Risikobewertung) はポピーシードによる被害防止のため、モルヒネの暫定最大1日摂取量を6.3 µg/kg/day、ポピーシード中のモルヒネの暫定ガイダンス値として4 µg/gを設定している。

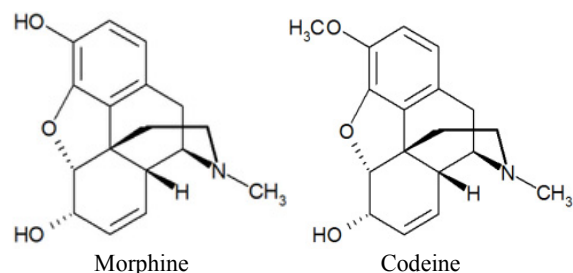


Fig. 2. Structures of Morphine and Codeine

日本では市販されているポピーシードのモルヒネ含有量実態の報告が少ない。そこで、ポピーシード中のアヘンアルカロイド（モルヒネ、コデイン）含有量を調査するための分析法を開発した。

実験方法

1. 標準品および試薬

- * 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1
- * Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan
- ** 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
- *** 東京都健康安全研究センター食品化学部

標準品：日局 塩酸モルヒネ(三共(株)製)，日局 リン酸コデイン(三共(株)製)

塩酸モルヒネ標準溶液：塩酸モルヒネをメタノールに溶解して500 µg/mL (モルヒネとして 380 µg/mL) に調製したものを標準原液とし、適宜希釈したものを標準溶液とした。

リン酸コデイン標準溶液：リン酸コデインをメタノールに溶解して500 µg/mL (コデインとして369 µg/mL) に調製したものを標準原液とし、適宜希釈したものを標準溶液とした。

固相抽出カラム：BOND ELUT MEGA-BE-C18 500MG(バリアン製)はメタノール1 mL，75%メタノール2 mLでコンディショニングし，OASIS MCX(3 cc, 60 mg) (ウオターズ社製)はメタノール1 mL，水1 mLでコンディショニングして使用した。

その他の試薬：和光純薬HPLC用，試薬特級を使用した。

2. 試料

平成 18 年 4 月都内デパートで購入したポピーシード(製菓材料)を試料とした。

試料粉末：試料はミキサー(オスター社製)で粉碎した。

3. 装置および測定条件

高速液体クロマトグラフ：日本分光製 LC-1500 シリーズ
高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置：

Waters 2690 (Waters 社製)，質量分析計：Quattro Ultima (MICROMASS 社製)

4. 試験溶液の調製

試料粉末 1.0 g を 50 mL 遠沈管にとり，75%メタノール 20 mL を加えて，60 分間超音波抽出し，遠心分離(3,000 rpm, 10 分)した。その上澄液 3 mL を OASIS MCX カートリッジに負荷し，0.1 mol/L 塩酸 2 mL，メタノール 2 mL で洗浄後，28%アンモニア水-メタノール (1:19) 2 mL で溶出し，減圧乾固した。残渣をメタノール 2 mL で溶解し，HPLC 用試験溶液とした。

5. 測定条件

1) HPLC の条件

カラム：CAPCELL PAK C18 UG120 (5 µm, 4.6 mm i.d. × 250 mm) 資生堂(株)製，移動相：0.1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH8.5) (A)-アセトニトリル(B) (グラジェント) A : B = 82:18 → (11 min) → 44:56 → (1 min) → 10:90 (7 min) → (1 min) → 82:18 (8 min)，流速：1.0 mL/min，カラム温度：40℃，検出波長：284 nm，注入量：20 µL

2) LC/MS/MS の条件

測定モード：ESI(+)，モニターイオン(m/z)：モルヒネ (286, 211, 201)，コデイン (300, 225, 215)，イオンソース温度：130℃，ディソルベーション温度：400℃，キャピ

ラリー電圧：3.00 kV，コーン電圧：60 V，コリジョンエネルギー電圧：25 eV，カラム：CAPCELL PAK C18 MGII (3 µm, 3.0 mm i.d. × 150 mm) 資生堂(株)製，移動相：0.1 mol/L ギ酸アンモニウム-アセトニトリル (75 : 25)，流速：0.2 mL/min，注入量：2 µL，カラム温度：40℃

結果及び考察

1. 抽出方法の検討

アルカロイドの抽出法としては，酸性溶媒で抽出後，アルカリ性にして，有機溶媒で抽出する方法が一般的である。酸性水溶液(酢酸，塩酸溶液)，有機溶媒およびアンモニア・アルカリ性有機溶媒での振とう抽出を行った。いずれの溶媒でも，乳化あるいはけん濁し，後の操作が困難であった。また，バイオミキサーによる混和抽出では，ポピーシードに多量に含まれる油脂により堅固な乳化が起きたため，超音波処理による抽出法を選択した。

2. 抽出溶媒の検討

試料粉末 1.0 g を 50 mL 遠沈管にとり，各抽出溶媒 20 mL を加えて，20 分間超音波抽出し，3,000 rpm，10 分間遠心分離した。その上澄液を試料溶液とした。

抽出溶媒 0.1 mol/L 塩酸，0.1 mol/L 塩酸-メタノール (1:9)，28%アンモニア水-メタノール (1:9)，メタノール，75%メタノールについて上記条件で抽出した。塩酸-メタノール，アンモニア水-メタノールは抽出率が高いが，乳化，けん濁がひどく，固相抽出カラムに負荷したとき，抽出液がカラムを通過しなかった。そこでけん濁が少なく，以後の精製処理が可能なメタノール-水系の抽出溶媒を選択した。

メタノール-水系で溶媒比率を変えて上記条件で抽出した結果は，Fig.3.のとおりであった。75%から100%メタノールで抽出率が高かった。油脂の移行も考慮して75%メタノールを選択した。

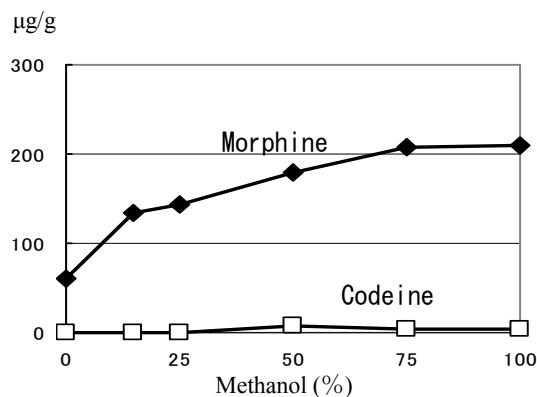


Fig. 3. Effect of Methanol-Water Ratio on Extraction

3. 抽出時間の検討

試料粉末 1.0 g にモルヒネおよびコデイン各 200 µg/g を添加し，75%メタノールで 10, 20, 60, 120 分まで超音波抽出した。この条件ではモルヒネは，60 分抽出で 90% 以上抽出され

たため、超音波による抽出時間は60分とした。60分抽出時の回収率はモルヒネで92.2%、コデインで112.6%であった。

4. 固相抽出カラムによる前処理の検討

逆相のBOND ELUT MEGA-BE-C18および逆相とカチオン交換機能のあるOASIS MCXによる精製を検討した。

BOND ELUT MEGA-BE-C18 に試料溶液1 mLを負荷した。1 mol/L塩酸-メタノール(1:9)溶出では2 mLで100%が溶出し、メタノール溶出では2 mLで80%、4 mLで100%が溶出した。しかし、HPLCクロマトグラムでは夾雑ピークの除去が不十分であった。

OASIS MCX に試料溶液 3 mLを負荷し、0.1 mol/L塩酸2 mL、メタノール2 mLで洗浄した。28%アンモニア水-メタノール(1:19) 2 mLでモルヒネの96%が溶出された。また、HPLCカラムの劣化に影響する抽出液中の油脂も除去され、HPLCクロマトグラムのモルヒネ、コデイン付近の夾雑ピークはほとんど認められなかった。

5. HPLCの条件の検討

モルヒネ、コデインのHPLCの分析には、逆相系カラム-イオン対試薬含有移動相の方法が一般的に用いられている¹⁻²⁾。しかし、溶媒に不揮発性のイオン対試薬が添加されているため、LC/MSへの適用を考慮すると不都合である。そこでLC/MS/MSでの確認定量を考慮して揮発性物質のみによる移動相条件を検討した。カラムには耐アルカリ性のCAPCELL PAK C18 UG120を用い、0.1 mol/Lギ酸アンモニウム溶液(A)とアセトニトリル(B)の組み合わせによる移動相について検討し、モルヒネ、コデインの分離の良い溶媒比率A:B=80:20を選択した。

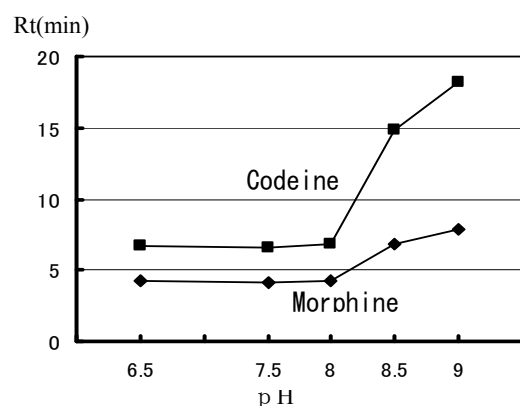


Fig. 4. Effect of pH of Ammonium Formate Solution in Mobile Phase on Retention Time of Morphine and Codeine

A:B=80:20移動相のpHについて検討したところ、AのpHが8.5(アンモニア水にて調整)の条件でモルヒネが6.8分、コデインが14.9分に溶出し、夾雑ピークとの分離も良好であった。(Fig. 4)

しかし、長時間に渡って夾雑ピークが溶出するため、測

定時間の短縮を考慮して、グラジエントシステムを組んだ。その条件で分析したところ、Fig. 5に示すようにモルヒネが6.6分にコデインが9.1分に溶出し、夾雑ピークも短時間で溶出した。

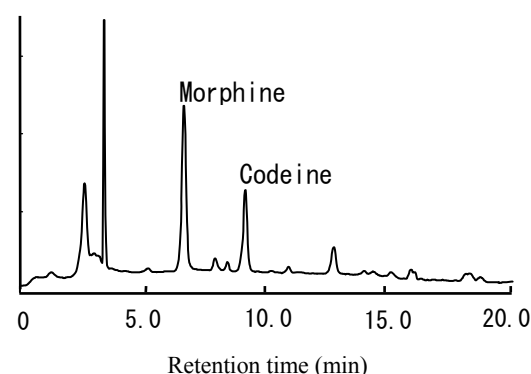


Fig. 5. HPLC Chromatogram of Poppy Seed Extract

モルヒネおよびコデインの検量線は、試料中の濃度として50~600 µg/gの範囲で相関係数0.999の良好な直線性が認められ、定量限界はともに0.5 µg/g (S/N=10)であった。

6. 添加回収試験

あらかじめモルヒネ、コデインを含まないことを確認した試料を用いて、添加回収試験を行った。試料粉末1.0 gにモルヒネ、コデイン各200 µg/gを添加し試験した結果、モルヒネの回収率は87.5%でCVは2.9% (n=7)、コデインの回収率は92.4%でCVは2.7% (n=7)であった。

7. 確認法の検討

HPLCでモルヒネ、コデインが検出された場合は、前報⁵⁾ではGC/MSを用いた長谷川ら⁴⁾の方法で確認したが、TFA誘導体が不安定であった。そこで誘導体化が不要のLC/MS/MSを適応したところ、簡便に確認することができた。

ま と め

1. 抽出溶媒は抽出率も良く、けん濁のない75%メタノールを選択した。
2. 精製にはOASIS MCXを用いることにより、回収率も高く、高い精製能が得られた。
3. HPLCは耐アルカリ性のCAPCELL PAK C18 UG120を用いてグラジエント分析を行うことにより、比較的短時間で良好なクロマトグラムが得られた。
4. 本法で分析した結果、モルヒネ、コデインの平均回収率は88%、92%、CVも3%以下と良好であった。

ポピーシードからアヘンアルカロイドが検出されるのは、収穫時に果実を破砕する機械が導入されたことにより、アヘンアルカロイドを含む果皮、乳液がポピーシード表面へ付着することが原因と言われている。ポピーシード表面に付着したアヘンアルカロイドは、適切な処理をすることで、

減少させることが可能と考えられる.

文 献

1) Gesundheitliche Bewertung Nr. 012/2006 des BfR vom 27. Dezember 2005.

2) 日本薬局方解説書編集委員会編：第14改正日本薬局方解説書，D27-31，2001，廣川書店，東京.

3) Yoshimatsu, K., Shimomura, K.: Plant Cell Reports, **11**, 132-136,1992.

4) 長谷川正紀，間瀬田千香暁，香川昌人，他：衛生化学，**38**, 192-195,1992.

5) 岩崎由美子，田端節子，木村圭介，他：第43回全国衛生化学技術協議会年会要旨，113-114, 2006.