

ノート

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた向精神薬の定量分析

柴田 正志, 小曾根 一 欽, 中村 吉美
松崎 隆 一, 矢ヶ崎 国 秀

Quantitative Analysis of Psychotropic drugs by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Masashi SHIBATA, Kazuyoshi KOSONE, Yoshimi NAKAMURA,
Ryuichi MATUZAKI, Kunihide YAGASAKI*

*Tokyo Customs Laboratory

5 - 5 - 30, Konan, Minato - ku, Tokyo 108 Japan

Psychotropic drugs have been regulated by Narcotics and Psychotropic Substances Law. According to the law, the total amount of their weight are limited when they are carried into Japan as hand baggages. Therefore quantitative analysis of psychotropic drugs are required.

We studied rapid and convenient determination of Diazepam and Triazolam in tablets by making use of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Diode Array Detector (DAD) and with auto sampler, and examined separation and of more than two peaks that each of retention time value is closed.

It was found that as for using auto sampler, to determine the quantitate of Diazepam and Triazolam by absolute calibration method bears comparison with by internal standard substance, and that gradient elution can be useful measure to separate and quantitate the peaks of psychotropic drugs which retention time value is closed in between.

1. 緒 言

最近, 携帯品や外国郵便を利用した向精神薬の不正輸入の事例が急激に増加している。これに対して関税定率法の改正により向精神薬が輸入禁制品に指定されるなど, より一層の取締り強化を図っている。このような状況の中において税関の分析部門には, 向精神薬の迅速・正確な分析が要求されている。

向精神薬の鑑定分析においては, 定性分析だけでなく, 携帯輸入に際しては総量規制があることから有効成分の定量分析についても必要となることがある。

向精神の鑑定分析においては, 定性分析だけでなく, 携帯輸入に際しては総量規制があることから有効成分の定量分析についても必要となることがある。

向精神薬の定量分析法においては倉園ら¹⁾及び島野ら²⁾がガスクロマトグラフ法について報告している。HPLC 法については

秋枝ら³⁾の報告があり, 日本薬局方⁴⁾にも一部のものについて記載されているが, 移動相にバッファーを使用しているものが多い。

著者らは, 税関分析への利便性を考慮し水 - メタノール混合液を移動相とする HPLC を用いて, 分析事例の多いジアゼパム及びトリアゾラムの定量法について, また, フルニトラゼパム - トリアゾラム二成分を含有するもの等, 多成分を含有するものについてグラジエント溶離による分離定量分析法について検討した。

2. 実 験

2. 1 試薬及び試料の調製

ジアゼパム 和光純薬製

トリアゾラム 日本アップジョン社より譲受

フルニトラゼパム 日本ロシュ社より譲受

試料を 0.02g/L ~ 0.10g/L のそれぞれの条件濃度になるように

メタノールに溶解し、メンブランフィルター（孔径 0.45 μm ）でろ過する。

2.2 装置

高速液体クロマトグラフ (HPLC); SERIES (ヒューレット・パッカード社製)

カラム; HYPERSIL ODS5 μ , 100 \times 2.1mm id (ヒューレット・パッカード社製)

検出器; フォトダイオードアレイ検出器 (200nm ~ 400nm)

カラム温度; 40

流量; 0.3ml/min

移動相; 水/メタノール = 30/70

水/メタノール (0/100) ~ (100/0) グラジエント

注入量; 10 μl

注入速度; 83 $\mu\text{l}/\text{min}$

試料の注入はオートサンプラーを用いて行った。

2.3 移動相の調製

メタノールは液体クロマトグラフィー用のものを使用した。

水は、蒸留水をメンブランフィルター（孔径 0.45 μm ）でろ過したものを使用した。

これらの溶媒は減圧脱気した後、ヘリウム置換脱気を行いな

がら送液ポンプによって所定の割合に混合した。

2.4 乳糖混合試料の調製

乳糖500mg を50ml 容メスフラスコに採り、ジアゼパム又はトリアゾラムのクロロホルム溶液を濃度が10mg/L になるように加え、乳糖を分散させよく混合し、クロロホルムを減圧除去した後、メタノールを加えて抽出し定容する。

これをメンブランフィルター（孔径 0.45 μm ）でろ過し検液とする。

乳糖500mg を50ml 容メスフラスコに採り、フルニトラゼパム及びトリアゾラムのクロロホルム溶液を各濃度が10 mg/L になるように加え、乳糖を分散させよく混合し、クロロホルムを減圧除去した後、メタノールを加えて抽出し定容する。

これをメンブランフィルター（孔径 0.45 μm ）でろ過し検液とする。

2.5 内部標準物質

ジアゼパムの定量の場合トリアゾラムを内部標準物質とする。

トリアゾラムの定量の場合ジアゼパムを内部標準物質とする。

フルニトラゼパム - トリアゾラム二成分の定量の場合ジアゼパムを内部標準物質とする。

内部標準物質として濃度が10mg/L になるように加える。

Table 1 Resolution at each Concentration

Methanol(%)	30	40	50	60	70	80	90
Resolution	11.4	11.2	9.1	6.3	4.1	2.3	1.2

3. 結果及び考察

3.1 ジアゼパム・トリアゾラムの定量

3.1.1 移動相の検討

移動相と保持時間の関係を Fig. 1 に示す。

Fig. 1 より、メタノール濃度減少に伴い、急激に保持時間が

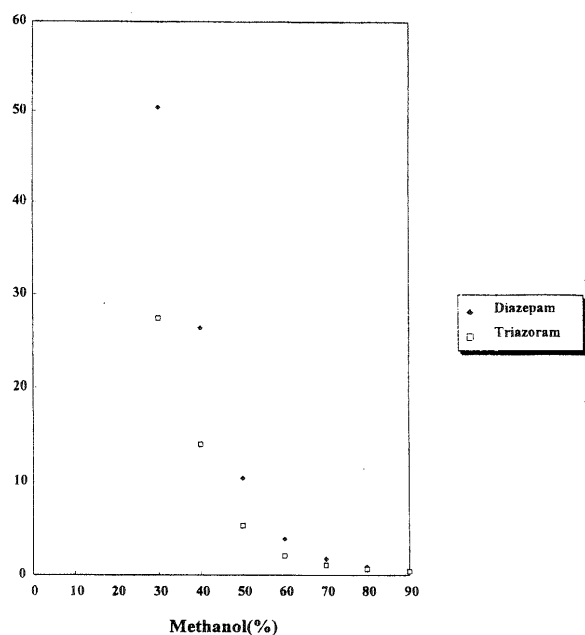


Fig. 1 Retention Time of Diazepam and Triazolam

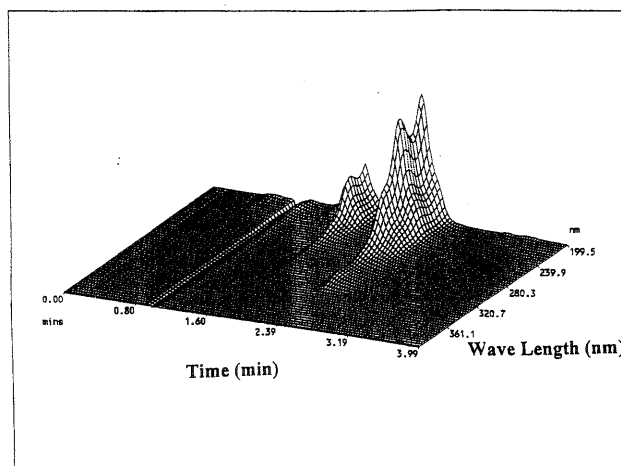


Fig. 2 3D - plot of Diazepam and Triazolam

長くなるということがわかる。また、各メタノール濃度における分離度を Table 1 に示す。内部標準法で測定する場合、メタノール70%以下ならば、分離度が4以上あり、測定には十分である。絶対検量線法で測定する場合、ピークの実分離を必要はないので、多くの分析サンプルを連続して測定するには、一回の測定時間は短い程、実験時間の短縮になる。しかし、80

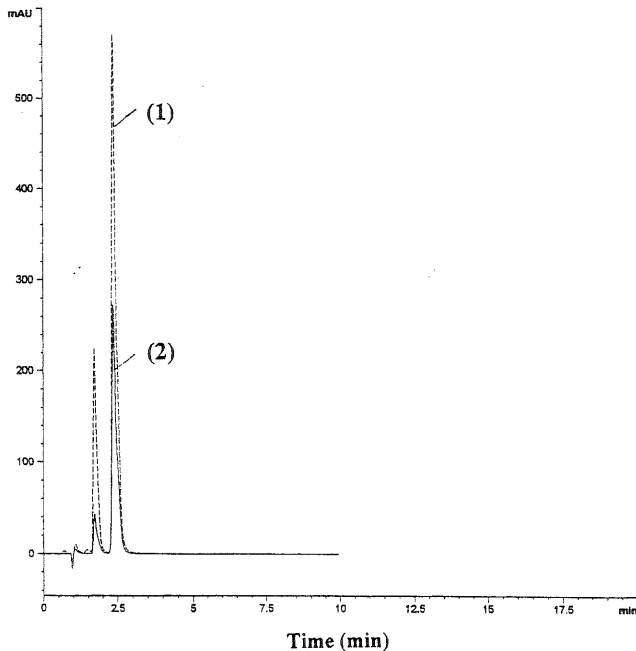


Fig. 3 Chromatograms of Diazepam and Triazolam

%以上では抽出溶媒の影響を受けるので、60~70%付近で測定を行うのが望ましいと考えられる。

3.1.2 DADを用いた検出

Fig. 2 にジアゼパム、トリアゾラムの混合試料を DAD を用いて測定した 3D プロットを示す。Fig. 2 に示すそれぞれのピークの吸収極大とおもわれる波長を用いて、プロットしたものを Fig. 3 - (1) に示す。また、254nm で測定したものを Fig. 3 - (2) に示す。このように DAD を用いることにより、多成分系や、定量する目的の物質以外に内部標準物質などの物質を導入した場合、それぞれの最適な測定波長をとることが可能になり、より感度の良い測定を行うことができる。

3.1.3 絶対検量線法と内部標準法の比較

絶対検量線法、内部標準法によって作成した検量線を Fig. 4 - 1, Fig. 4 - 2 に示す。これにより、ほぼ同等の直線性を持った検量線が得られた。オートサンプラーの導入により非常に高い精度で試料溶液を注入できるようになったことが主要因として考えられる。

3.1.4 再現性等の検討

乳糖混合試料 を測定した結果を Table 2 に示す。この表に示すように回収率及び再現性は非常に良好であった。通常の錠剤は賦形剤として乳糖が多く用いられておりこの乳糖に影響されことなく定量を行うことができると考えられる。

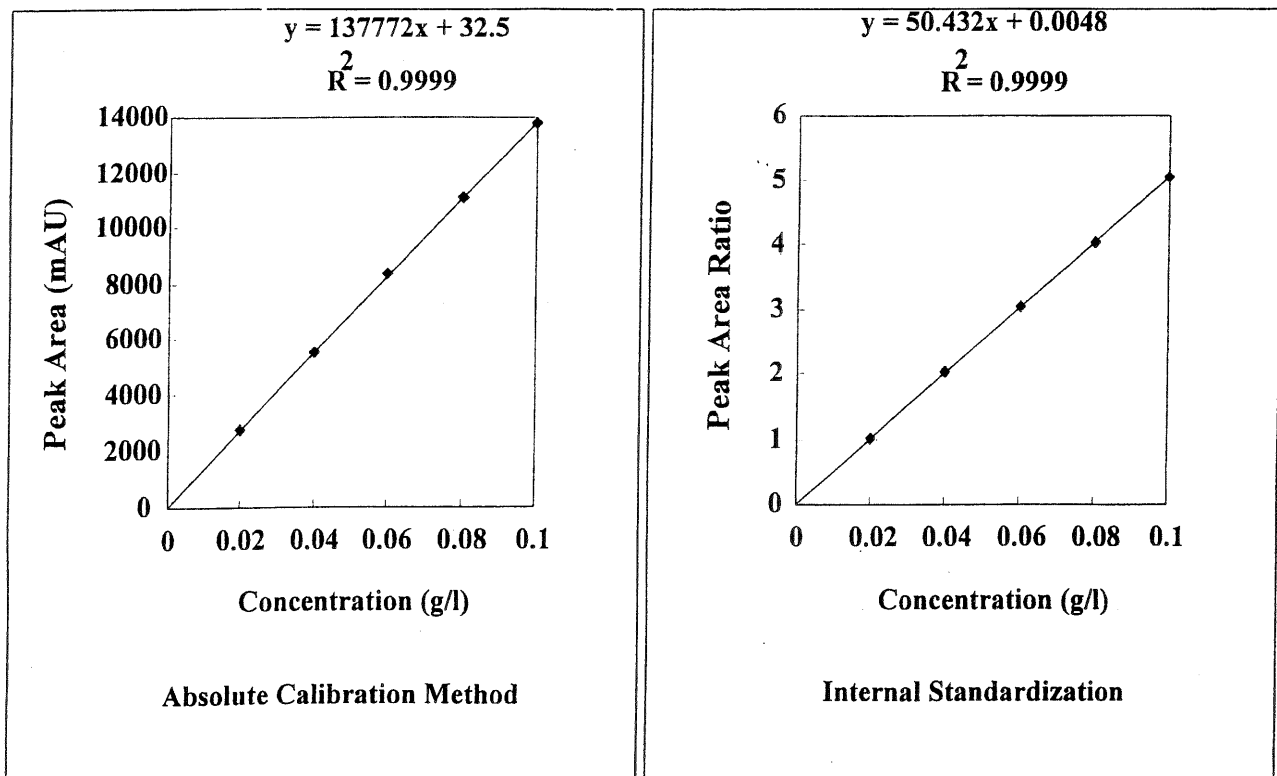


Fig. 4 - 1 Calibration Curve of Diazepam by Absolute Calibration Method and Internal Standardization

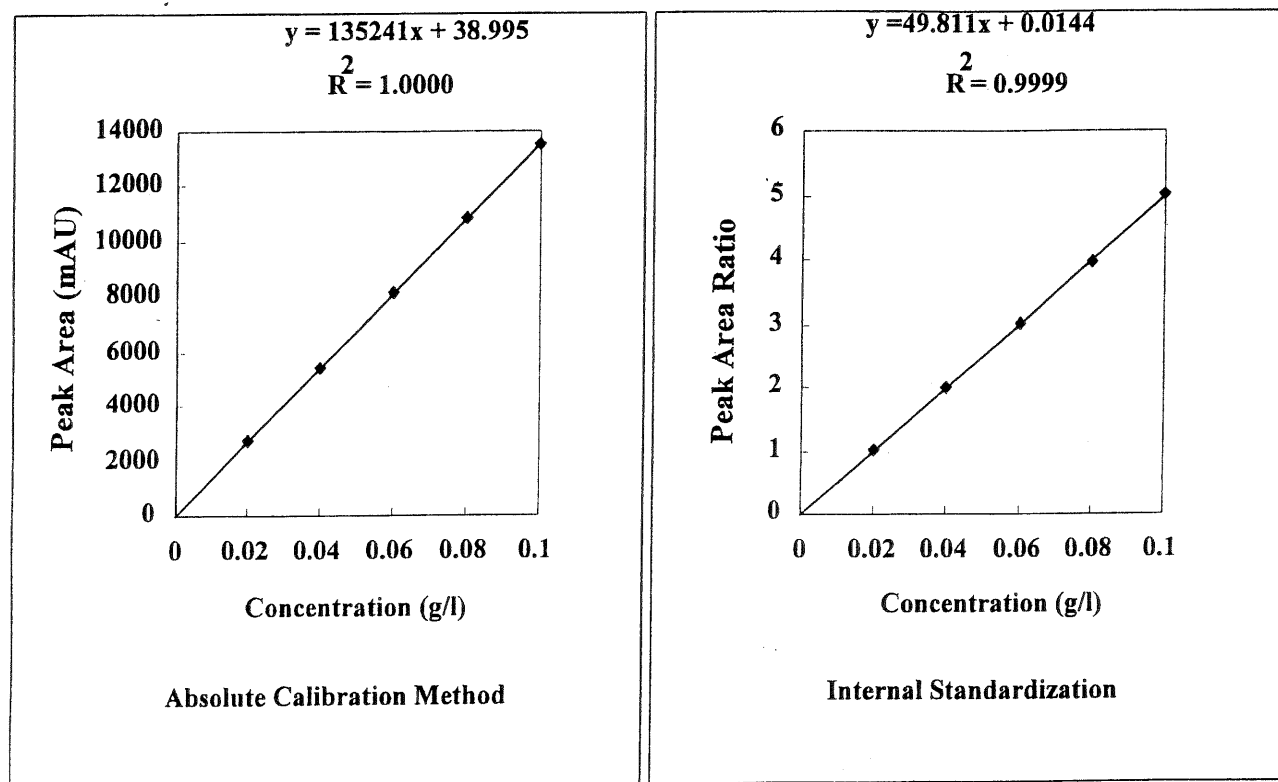


Fig. 4 - 2 Calibration Curve of Triazolam by Absolute Calibration Method and Internal Standardization

Table 2 Recovery and Dispersion of Diazepam and Triazolam

Diazepam			Triazolam			
Added Quantity mg	Results of Quantitation mg		Recovery %	Added Quantity mg	Results of Quantitation mg	Recovery %
10.0	10.075		100.75	10.0	9.998	99.983
10.0	10.083		100.83	10.0	9.977	99.774
10.0	10.087		100.87	10.0	9.993	99.928
10.0	10.052		100.52	10.0	10.017	100.165
10.0	10.095		100.95	10.0	10.018	100.182
Average		10.078	100.78			10.078
Standard Deviation		0.0147				0.0154
CV (%)		0.146				0.153

3.2 グラジエントを用いた薬物の分離定量

錠剤中に含有される薬物が単一の場合、ピークは一つなので定量するのは容易であるが、複数の薬物が入っている場合は、目的の物質のピークが他の物質のピークと重なり、定量を妨げられることがある。これを定量可能な状態にするためにはピークを分離する必要があるが、このためには溶媒組成を変えるなどの処置をしなければならない。適切な溶媒組成決定のためには多くの経験と手間が必要となるが、グラジエント溶離を用いれば様々な薬物に対して比較的楽に分離が可能となることがある。今回は、実際に分析実績のあるトリアゾラム、フルニトラゼパム混合物を用い、グラジエント溶離を用いた薬物の分離及び定量性について検討した。

結果を Fig. 5 に示す。移動相組成を一定にした場合は、ト

リアゾラム、フルニトラゼパムのピークは重なってしまっているが、グラジエントをかけることにより分離されていることがわかる。このように分離された結果は次のように考察できる。溶液組成による試料の移動速度について考えると、カラムの長さを L とすると、グラジエント溶離において溶媒組成比は一定の割合で変化させているので、溶媒組成に対する保持時間を表した Fig. 6 より Fig. 7 - (a) のように移動時間に対する移動速度の変化を示すことができる。この曲線をフルニトラゼパム、トリアゾラムについて $f(t)_{fu, grad}$, $f(t)_{tri, grad}$ とする。同様に移動相を一定（メタノール70%）にしたとき移動時間に対する移動速度 $f(t)_{fu, grad}$, $f(t)_{tri, grad}$ は Fig. 7 - (b) のように表せる。物質がカラムを通り抜けるのに要する時間を T とすると、

$$L = \int_0^T f(t) dt$$

と表せる。一定の移動相で測定する時、フルニトラゼパムが溶出した時間を $T_{f,c}$ とすると、この時のトリアゾラムの移動距離は

$$\int_0^{T_{f,c}} f(t)_{tri, const} dt$$

である。従って、トリアゾラムが溶出するために必要な残りの移動距離は

$$L - \int_0^{T_{f,c}} f(t)_{tri, const} dt$$

である。同様にグラジエントをかけた場合も

$$L - \int_0^{T_{f,c}} f(t)_{tri, grad} dt$$

である。

すなわち、トリアゾラムが溶出するのに要する時間を $T_{t,c}$ とすると

$$T_{t,c} - T_{f,c} = [L - \int_0^{T_{f,c}} f(t)_{tri, const} dt] / f(T_{t,c})_{tri, const}$$

と表せる。同様にグラジエントをかけた場合も

$$T_{t,g} - T_{f,g} = [L - \int_0^{T_{f,g}} f(t)_{tri, grad} dt] / f(T_{t,g})_{tri, grad}$$

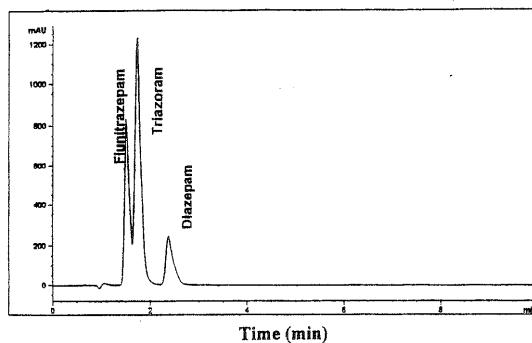
$T_{flu,g}$ の時、メタノール濃度が70%以下であれば

$$\int_0^{T_{f,g}} f(t)_{tri, grad} dt < \int_0^{T_{f,c}} f(t)_{tri, const} dt, \quad f(T_{flu,g})_{tri, grad} < f(T_{flu,c})_{tri, const} = f(0)$$

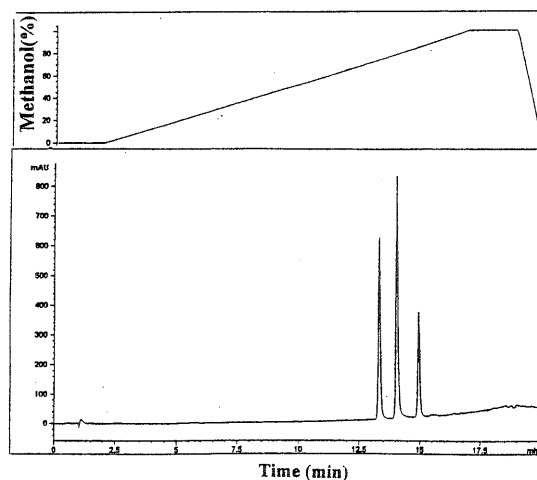
であるので

$$T_{flu,c} - T_{tri,c} < T_{flu,g} - T_{tri,g}$$

となり、グラジエントを用いた方が物質による移動時間の差が大きくなる。従って、Fig.5のように分離されたものと考えられる。



(1) Water/Methanol=30/70



(2) Water/Methanol=(0/100)~(100/0)

Fig.5 Chromatograms of Flunitrazepam, Triazolam and Diazepam

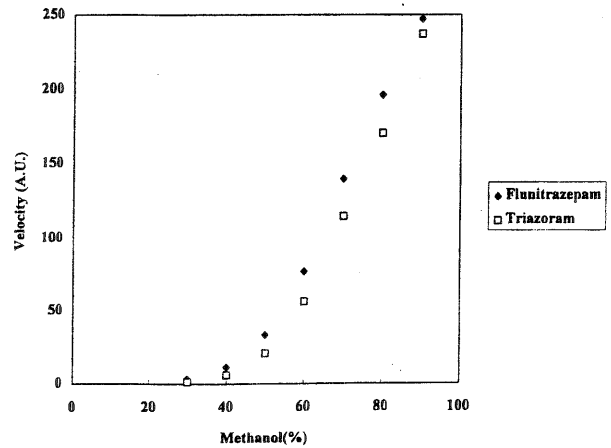


Fig. 6 Velocity of Flunitrazepam and Triazolam

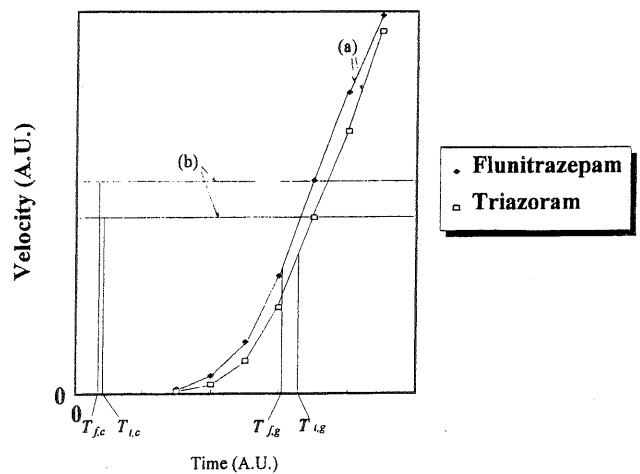


Fig. 7 Velocity of Flunitrazepam and Triazolam

これを定量する際、グラジエントをかけたことによってメタノール濃度の上昇によりベースラインの上昇が問題となるが、Fig.8のようにブランクの溶液を同様にグラジエントをかけて測定しクロマトグラムの減算処理を行うことによってベースラインを補正することができる。

以上のようにして得られたクロマトグラムについて、ジアゼパムを内部標準物質とした内部標準法と絶対検量線法により作成

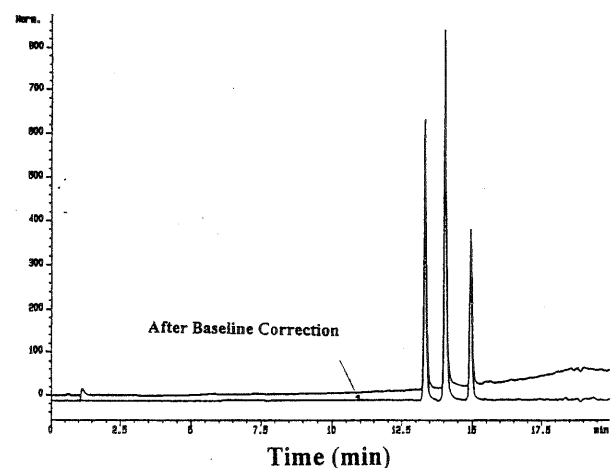


Fig. 8 Chromatogram Before and After Baseline Correction

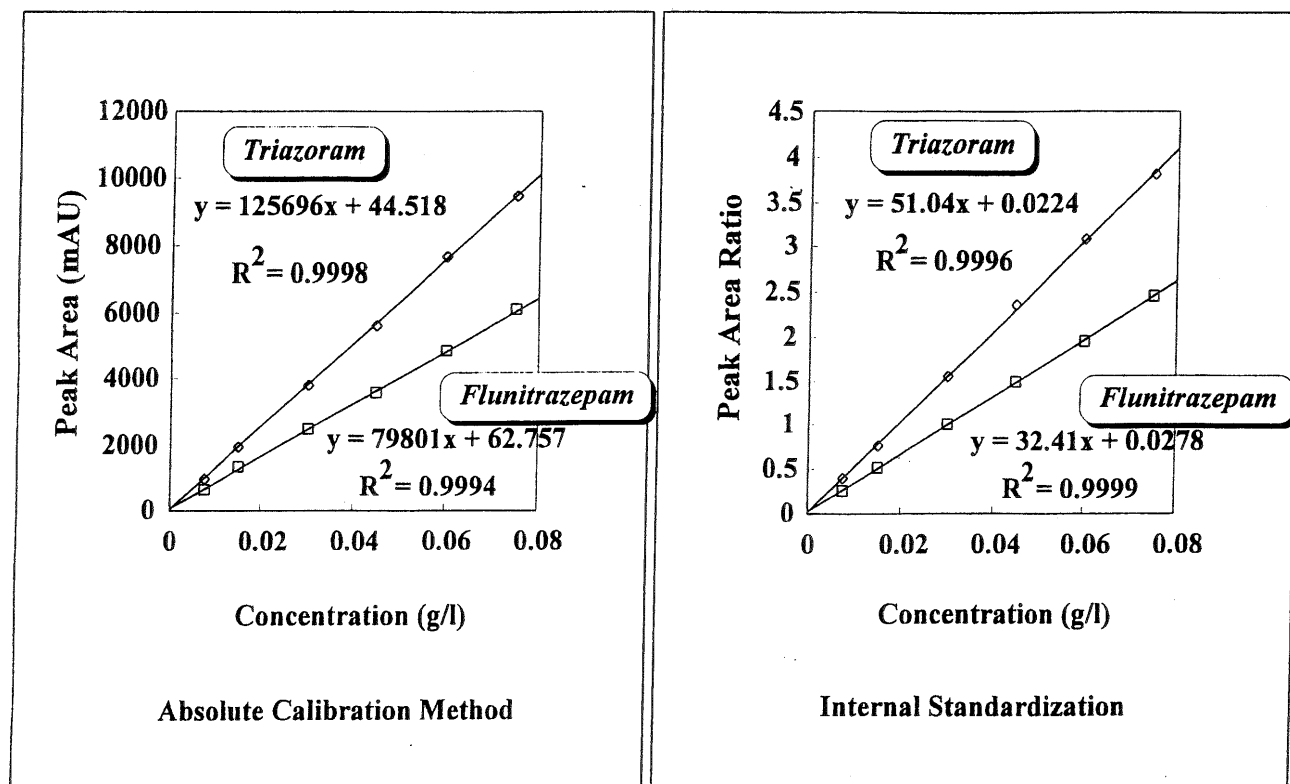


Fig.9 Calibration Curve of Triazolam Flunitrazepam by Absolute Calibration Method and Internal Standardization

Table 3 Recovery and Dispersion of Flunitrazepam and Triazolam

Flunitrazepam			Triazolam			
Added Quantity mg	Results of Quantitation mg		Recovery %	Added Quantity mg	Results of Quantitation mg	Recovery %
	10.1	10.006	99.069	10.2	10.309	101.06
	10.1	9.982	98.836	10.2	10.078	98.80
	10.1	10.100	99.997	10.2	10.223	100.22
	10.1	10.202	101.013	10.2	10.230	100.29
	10.1	10.039	99.394	10.2	10.274	100.73
Average		10.066	99.662		10.223	100.01
Standard Deviation		0.0788			0.0788	
CV (%)		0.783			0.771	

した検量線を Fig. 9に示す。Fig. 9に示すように、内部標準法と絶対検量線法共に高い直線性を示す。また、乳糖混合試料 について回収率及び再現性の実験結果を Table. 3に示す。これらの結果からグラジエントをかけて測定しても十分な定量性を得られることが確認できた。

4. 要 約

ジアゼパム及びトリアゾラムについて、移動相の条件について検討した結果、連続迅速分析の必要性から、おおそ水：メタノール = (40/60) ~ (30/70) で測定することが望ましいと考えられる。この条件でオートインジェクターを用いた絶対検量線法と内部標準法について検量線を比較した結果、絶対検量

線法でも内部標準法と遜色のない直線性が得られた。

また、ピークが分離しにくいものの分離法として、また、簡便に分離条件を探すための手段としてグラジエント溶離を用いることを検討した。トリアゾラム、フルニトラゼパム、ジアゼパムの3成分系混合溶液について、グラジエント溶離を用い十分に分離することができた。また、内部標準法による検量線と、絶対検量線法による検量線を作成し比較した結果、グラジエント中においてもほぼ同等の直線性が得られた。この条件においてトリアゾラム及びフルニトラゼパムについて回収率及び再現性も良好であったことから、定量分析において、グラジエント溶離による、絶対検量線法を適用できると考えられる。

5. 謝 辞

試料を提供して頂いた日本アップジョン社及び日本ロシュ社の方々に謝意を表します。

文 献

- 1) 倉園久美, 松崎隆一, 永井雅子, 印出進, 矢ヶ崎国秀: 本誌 33, 49 (1994)
- 2) 島野雅子, 井上陽子, 松崎隆一, 印出進, 矢ヶ崎国秀: 本誌 34, 87 (1995)
- 3) 秋枝毅, 猪間進: 本誌 34, 65 (1995)
- 4) (財)日本公定書協会監修; 日本薬局方 第十二改正, 廣川書店 (1991)