

ノート

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による ベンゾジアゼピン系向精神薬製剤の定量分析法について

朝 長 洋 佑*, 川 口 利 宗*, 山 崎 光 廣**, 猪 間 進**

Yosuke TOMONAGA*, Toshimune KAWAGUCHI*,

Mitsuhiro YAMAZAKI**, Susumu INOMA**

*Osaka Customs Laboratory

4-10-3, Chikko, Minato-ku, Osaka-shi, 552 Japan

**Central Customs Laboratory

531, Iwase, Matsudo-shi, Chiba-ken, 271 Japan

We tried to determine by HPLC of benzodiazepines' tablets which contain Alprazolam, Estazolam, Diazepam or Chlordiazepoxide, using of extracting system of Methanol : Water (70:30), ultrasonication and hand shake, then we got satisfactory results.

In these try, we find some effects for determination. When tablets are ground in mortar, determination value will decrease by getting humidity, or increase by drying. Some benzodiazepines are subjected to influence of daylight.

1 緒 言

向精神薬については、抽出物の赤外吸収スペクトルや GC-MS 等により定性分析を行っており、本報 31 号においても TLC、HPLC による定性分析法が報告されている¹⁾。定量分析法については、本報 34 号においてベンゾジアゼピン類及びバルピタール類の HPLC 法による定量法が報告されており²⁾、抽出条件、適当な内部標準物質を設定できればベンゾジアゼピン系向精神薬の定量分析が可能であると考えられる。しかし、具体的な定量方法については、錠剤などの製剤中の向精神薬の抽出方法など検討されていない部分があった。

今回、厚生省の迅速定量法³⁾等を参考にし、メタノール・水系の抽出液を用いてベンゾジアゼピン系向精神薬 4 種（アルプラゾラム、エスタゾラム、ジアゼパムおよびクロルジアゼポキシド）の迅速な抽出法、定量法について検討したところ、いくつかの所見が得られたので報告する。

2. 実 験

2.1 試 料

(1) ベンゾジアゼピン系向精神薬標準品

アルプラゾラム、エスタゾラム、クロルジアゼポキシド、ジアゼパム

((株)武田薬品工業より譲受)

(2) ベンゾジアゼピン系向精神薬製剤

アルプラゾラム 0.4mg 錠、エスタゾラム 2mg 錠

クロルジアゼポキシド 5mg 錠（糖衣錠）、ジアゼパム 2mg 錠

（以上、(株)武田薬品工業より譲受）

ジアゼパム 5mg 錠

(3) 内部標準物質

パラヒドロキシ安息香酸メチル、パラヒドロキシ安息香酸エチル、安息香酸メチル

2.2 測定装置および測定条件

HPLC：島津 LC-6A system, LC-10A system

測定は、自動面積測定法による

カラム：Inertsil ODS-2 4.6mmφ×15cm

カラム温度：40℃

移動相：メタノール・水混液（70：30）

流量：1ml/min.

検出：UV254nm

（その他）

*大阪税関業務部分析部門 〒552 大阪市港区築港4-10-3

**大蔵省関税中央分析所 〒271 千葉県松戸市岩瀬531

超音波洗浄器

遠心分離器：毎分3000回転

振とう器：共栓試験管を水平に支持し、試験管の軸方向に毎分200回転とう

試験管ミキサー：Bortex Mixer 試験管を振動させ、内部液に回転運動を与えるもの

2.3 HPLC注入液の調製

試料の調製は、次の方法を基準として、問題があれば検討することとした。

2.3.1 錠剤からの調製

(1) 抽出液

メタノール：水混液 (70：30)

(2) 抽出

超音波照射後、振とう抽出

(3) 濾過

抽出液をメンブランフィルターで濾過

2.3.2 標準溶液の調製

錠剤の定量に使用する標準溶液は、試料溶液に近似した濃度のものとし、試料溶液と同様の抽出操作を行う。

3. 結果及び考察

3.1 試料のクロマトグラム

目的物質 (ベンゾジアゼピン系向精神薬) と、内部標準物質として検討した物質のクロマトグラムを示す (Fig. 1, Table 1)。

パラヒドロキシ安息香酸メチル、パラヒドロキシ安息香酸エチルは、吸光度・クロマトグラムの形状共に良好であるが、安息香酸メチルは吸光度が低く、少なくとも UV254nm での検出は前記2物質と比較するとやや劣る。

4種の目的物質は、パラヒドロキシ安息香酸メチル又は、パラヒドロキシ安息香酸エチルに対して十分分離しており、これらを内部標準物質として用いることができる。

3.2 抽出条件の検討

3.2.1 ジアゼパム2mg錠の定量結果

錠剤に水又はメタノール・水混液を加えて超音波照射すると、前もって粉碎することなく崩壊させることができる。抽出液 (メタノール・水混液 (70：30) (注) 4ml でジアゼパムの錠剤 (約 0.1g/個) に超音波照射した場合 2～3 分程度でほぼ完全に崩壊した。抽出液に内部標準物質を加えておき、内部標準法により定量を試みた。

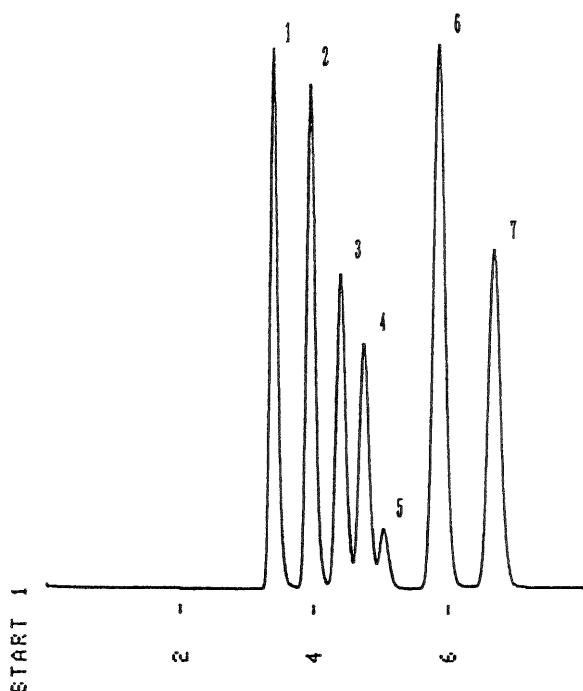


Fig.1 High Performance Liquid Chromatogram(HPLC)of benzodiazepines and internal standards

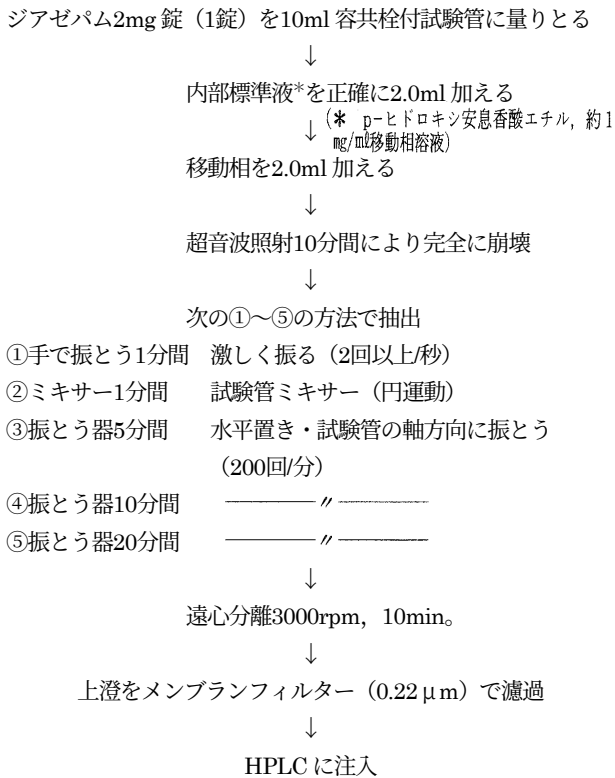
Col. : Inertsil ODS-2, 0.46φ×150mm
 Elu. : methanol : H₂O=70:30
 F.Rate : 1ml/min
 Det. : UV254nm
 Inj.Vol. : 10 μl

Table 1 High Performance Liquid Chromatogram (HPLC) of benzodiazepines and internal standards

PKNO	TIME	AREA	NAME
1	3.413	82148	p-Hydroxymethylbenzoate
2	3.965	82962	p-Hydroxyethylbenzoate
3	4.418	57824	Estazolam
4	4.767	47740	Alprazolam
5	5.068	11182	Methylbenzoate
6	5.873	118677	Chlordiazepoxide
7	6.697	80660	Diazepam

TOTAL 481193

approx. 0.05mg/ml (No. 1, 2) and 0.1mg/ml (other)



標準溶液として，標準ジアゼパム溶液（約1.0g/ml，移動相溶液）2.0ml に内部標準溶液を正確に2.0ml 加え，試料同様に遠心分離，フィルター濾過したものを，HPLC に注入した。

結果を Fig. 2，Table 2 に示す。振とう方法の違いにより有為な差は認められず，超音波照射により完全に崩壊させ，適当な振とう方法により混合，均質化すれば，十分に抽出されるものとする。

（注）厚生省・迅速分析法によると，メタノール・水混液（50：50）で抽出されにくいものがあるので，崩壊に問題がなければメタノールで抽出，または水で崩壊させたのちメタノールで抽出すればよいとしている。

3. 2. 2 その他の錠剤の定量結果

他の向精神薬の錠剤についても，ジアゼパムと同じ抽出条件を用いることができるか検証した。ここで，完全に抽出されたかどうかを確認する方法として，超音波照射・振とう抽出した上澄液を一次抽出液とし，残液に抽出液を加えてさらに超音波照射・振とう抽出したものを二次抽出液としてこれを比較する方法を採った。

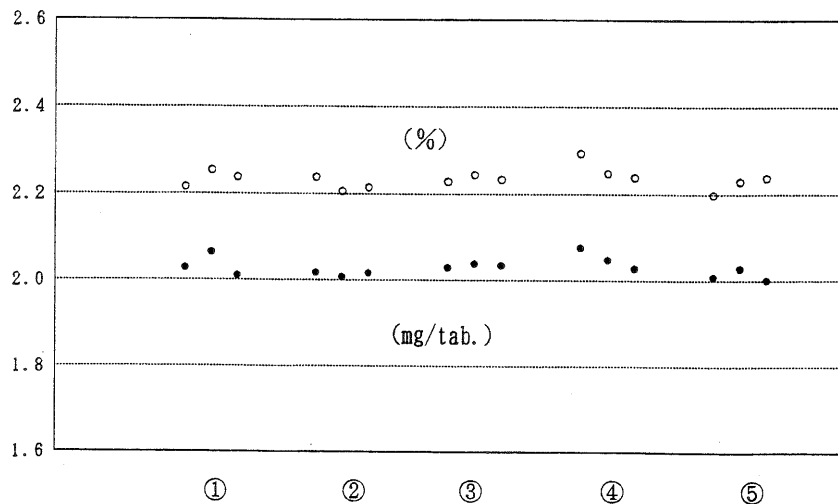
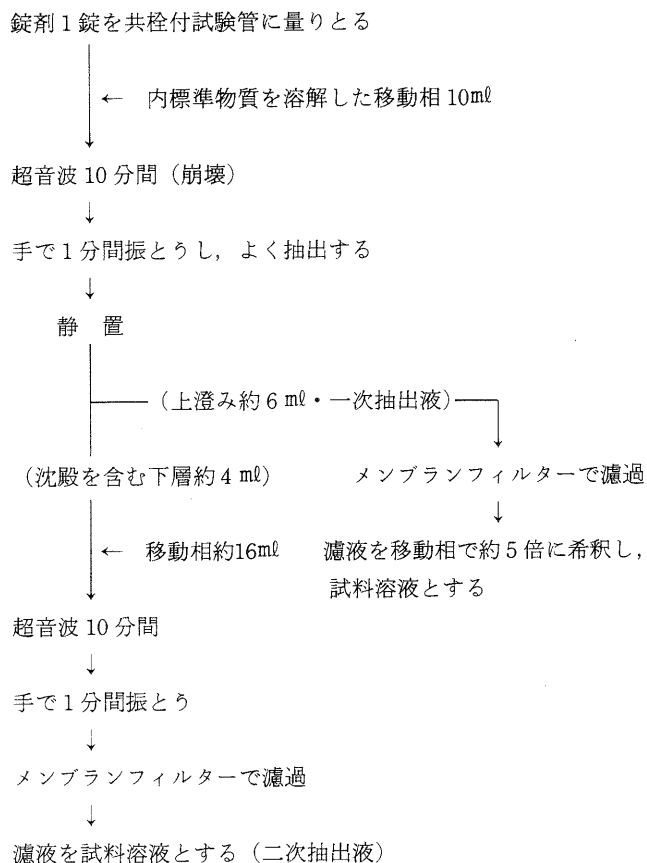


Fig.2 Determination value of Diazepam 2mg tablet

Table 2 Determination value of Diazepam 2mg tablet

ジアゼパム2mg錠を，抽出方法を変えて定量

	mg (%)	mg (%)	mg (%)	mg (%)
①手で激しく振る（1分間）	2.03(2.21)	2.06(2.25)	2.01(2.24)	2.03(2.23)
②試験管ミキサー（1分間）	2.02(2.24)	2.01(2.21)	2.02(2.21)	2.01(2.22)
③振とう器（5分間）	2.03(2.23)	2.04(2.24)	2.03(2.23)	2.03(2.23)
④振とう器（10分間）	2.07(2.29)	2.05(2.25)	2.03(2.24)	2.05(2.26)
⑤振とう器（20分間）	2.01(2.20)	2.03(2.23)	2.00(2.24)	2.01(2.22)



一次抽出液、二次抽出液、および近似した濃度の標準溶液をそれぞれ HPLC に注入し、内部標準法により定量する。

実験の結果 (Fig. 3, Table 3), アルプラザラムに 1 個異常値がある他は、かなり高濃度にもかかわらず、いずれの定量結果もほぼ表示含有量に近いものであり、一次抽出液と二次抽出液は近似した定量結果を示した。この結果から、実験に用いた 4 種の向精神薬についてはこの条件で十分に抽出されるものと考ええる。

3.3 試料採取方法

錠剤の場合、粉末としてその一部を定量用に採取すると、試薬の使用量を減少できる等の利点がある。ジアゼパムを含有する錠剤を乳鉢で粉碎し、その一部を量りとして定量した結果と、錠剤まるごと量りとして定量した結果を比較した (Fig. 4, Table 4)。

乳鉢中で粉碎して一部を量りとしたものは、粉碎せずに量りとしたものと比べると明らかに低い含有割合を示した。また、粉碎した残りを秤量瓶に入れ、デシケーター中で保存しておくと、目的物質の含有割合は僅かに増加している。原因としては、乳鉢で粉碎する際に吸湿し、保存中に徐々に乾燥したものと推定される。

この結果から、錠剤を乳鉢などで粉末とするのは適当でないと考える。

3.4 試料溶液 (HPLC 用) の調製

メスフラスコにサンプルを入れ、抽出・定容後、その一部に内部標準物質を加える方法をとれば、最初から内部標準物質を加えるより調製が容易で、試薬の使用量も抑えられる。しかし、

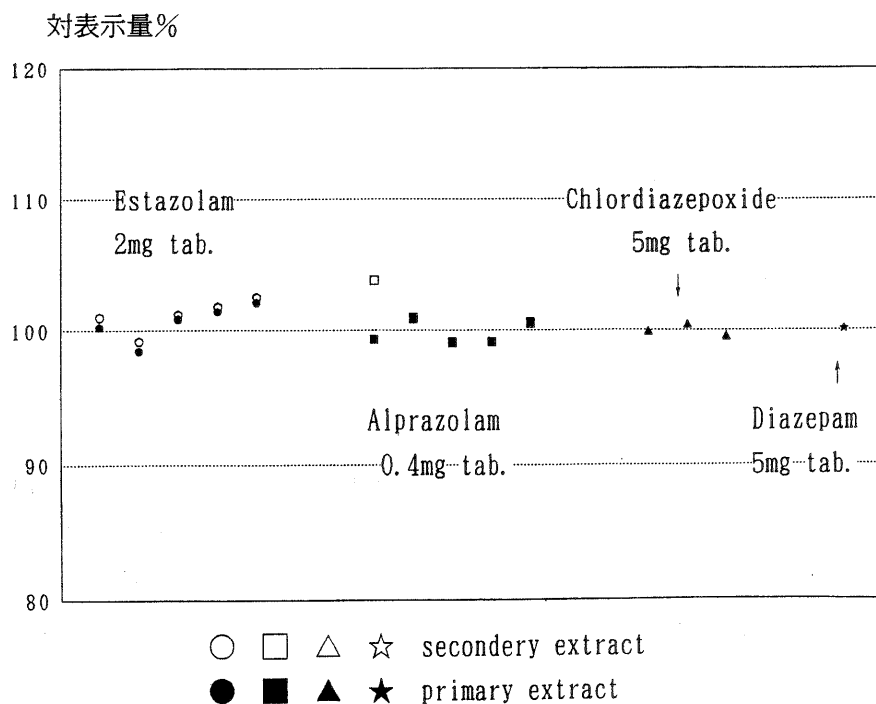


Fig.3 Determination values of benzodiazepine-tablets

Table 3 Determination values of benzodiazepine—tablets

錠剤	採取量	内部標準物質・抽出液 (1次抽出液量)	定量結果(対表示量%)	
			1次抽出液	2次抽出液
Estazolam 2mg tablet	1錠	パラヒドロキシ安息香酸メチル	100.20	100.95
	1錠	0.27mg/ml移動相溶液	98.40	99.15
	1錠	(10ml)	100.80	101.15
	1錠		101.35	101.75
	1錠		102.05	102.50
Alprazolam 0.4mg tablet	3錠	パラヒドロキシ安息香酸メチル	99.25	103.75
	1錠	0.27mg/ml移動相溶液	100.78	100.93
	1錠	(10ml)	99.08	99.03
	1錠		99.05	99.10
	1錠		100.55	100.45
Chlordiazepoxide 5mg tablet	1錠	パラヒドロキシ安息香酸エチル	99.80	99.86
	1錠	0.27mg/ml移動相溶液	100.40	100.40
	1錠	(10ml)	99.54	99.48
Diazepam 5mg tablet	1錠	パラヒドロキシ安息香酸エチル	100.02	100.10
		0.27mg/ml移動相溶液 (10ml)		

メタノールの割合が大きい抽出液では乳糖も完全に溶解せず、不溶物を生ずる場合がある。これが定量結果にプラスの誤差を与える恐れがあるので、不溶物が多い場合には特に注意する必要がある (Fig. 5, Table 5)。

3.5 光による影響

標準物質により検量線を作成した結果、良好な直線性が得られ (いずれも $r=0.9999$ 以上 Fig. 6, Table 6), クロルジアゼポキシドを除く3種は1点検量線の傾きも変化が小さい (Fig.

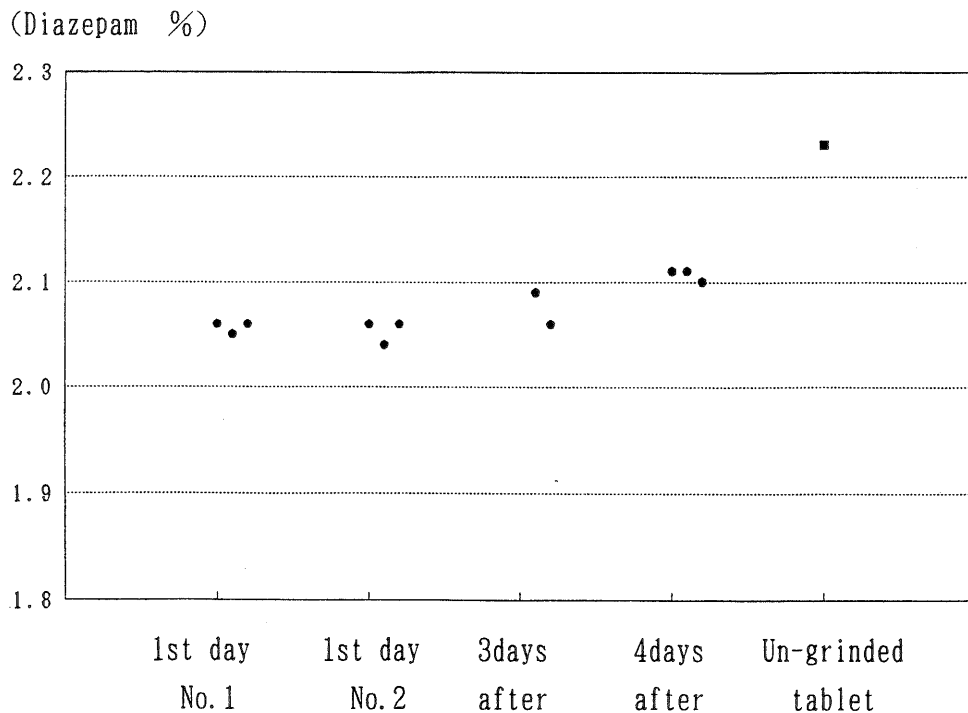


Fig. 4 Determination of Diazepam tablets ground in mortar, and stored in weighing bottle.

Table 4 Determination of Diazepam tablet ground in mortar, and stored in weighing bottle.

(乳鉢で粉碎した試料の定量結果)

初日(1)	初日(2)	3日後	4日後	(粉碎しない錠剤の平均値)
2.06%	2.06%	—	2.11%	
2.05%	2.04%	2.06%	2.11%	2.23%
2.06%	2.06%	2.09%	2.10%	

粉碎、秤量し定量した試料の残りは秤量瓶にいれデシケーター中で保存し、3日後および4日後、さらに秤量し定量した。

8, Table 8) が, クロルジアゼポキッドについては, 1点検量線の傾きの変化が大きく, 異常を示した。

そこで光による影響³を考慮して, クロルジアゼポキッドのみ再度, 暗室で溶解, 調製を行った結果, 内部標準物質に対するクロルジアゼポキッドの面積比が増加し, 1点検量線の傾きの変化が小さくなった (Fig. 7, 8, Table 7, 8)。

この結果から, 目的物質によっては光により分解されやすいものがあり, 標準溶液や試料溶液を暗室のなかで調製するなどの適当な方法で遮光する必要があることが分かった。

糖衣錠のように内部を遮光したものは, 光による変質を防ぐためである可能性があるので注意を要する。

Table 5 Influence of insoluble residue.

Lactose	HPLC area		HPLC Area ratio Diazepam/P-HEB	Ratio for Blunc
	Diazepam	P-HEB		
(Blunc)	916718	83773	1.0942	(100.00%)
0.50 g	936190	854374	1.0958	100.14
1.00 g	947847	860094	1.1020	100.71
2.00 g	961831	863335	1.1141	101.82

Lactose and 10 ml of Diazepam solution added into 50 ml measuring flask, filled up with MeOH : H₂O (7 : 3). 10 ml of this extract mix with 10 ml of p-Hydroxyethylbenzoate (p-HEB) solution, inject 10 μ l into HPLC.

(Ratio of Diazepam/p-Hydroxymethylbenzoate)

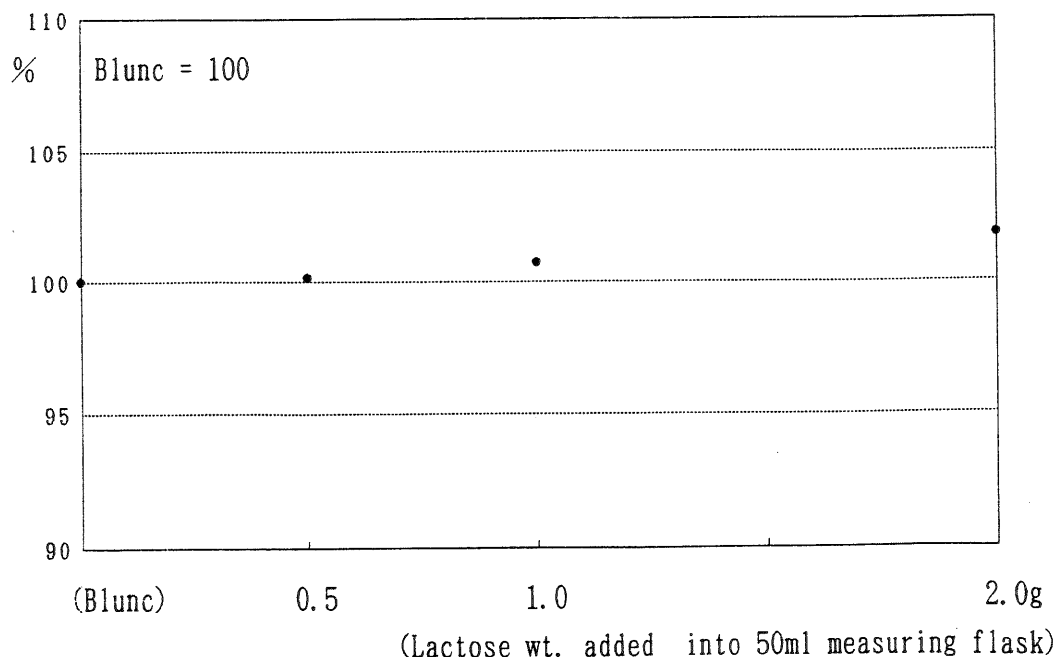


Fig. 5 Influence of insoluble residue.

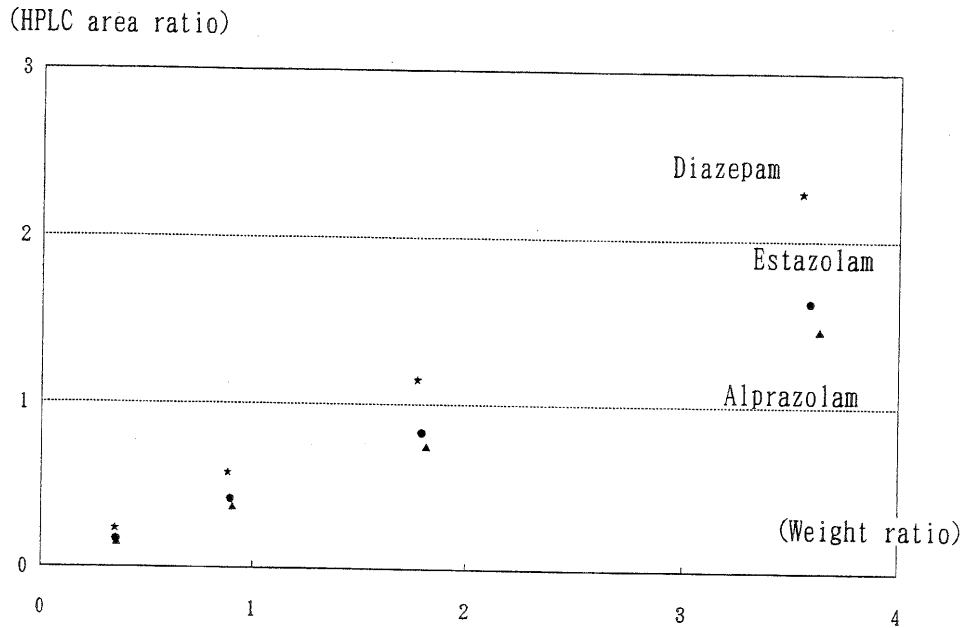


Fig. 6 Calibration Curves of Alprazolam, Estazolam and Diazepam.

Table 6 Calibration results of Alprazolam, Estazolam and Diazepam. Each injection volume : 10 μ l

Calibration result of Alprazolam					
Conc of solution (mg/ml)		Weight ratio	HPLC area		HPLC Area ratio
Alprazolam	p-HMB	Alprazolam/p-HMB	Alprazolam	p-HMB	Alprazolam/p-HMB
0.02000	0.05512	0.36284	242908	1644363	0.14772
0.05013	0.05512	0.90947	607930	1652446	0.36812
0.09573	0.05512	1.73676	1158462	1648857	0.70259
0.20048	0.05512	3.63716	2396303	1646000	1.45583
(p-HMB:p-Hydroxymethylbennzoate)					
$y=2.54041x-0.01261$ ($r=0.99998$)					
Calibration result of Estazolam					
Conc of solution (mg/ml)		Weight ratio	HPLC area		HPLC Area ratio
Estazolam	p-HMB	Estazolam/p-HMB	Estazolam	p-HMB	Estazolam/p-HMB
0.01961	0.05512	0.35577	268975	1632657	0.16475
0.04957	0.05512	0.89931	666698	1615797	0.41261
0.09888	0.05512	1.79390	1302514	1593713	0.81728
0.19796	0.05512	3.59144	2546396	1567376	1.62462
$y=2.21762x-0.01379$ ($r=0.99999$)					
Calibration result of Diazepam					
Conc of solution (mg/ml)		Weight ratio	HPLC area		HPLC Area ratio
Diazepam	p-HEB	Diazepam/p-HEB	Diazepam	p-HEB	Diazepam/p-HEB
0.01994	0.0563	0.35417	354974	1541609	0.23026
0.04975	0.0563	0.88366	891013	1555015	0.57299
0.09989	0.0563	1.77425	1808605	1577802	1.14628
0.20000	0.0563	3.55240	3632390	1587667	2.28788
(p-HMB:p-Hydroxyethylbennzoate)					
$y=1.55485x-0.00601$ ($r=0.99999$)					

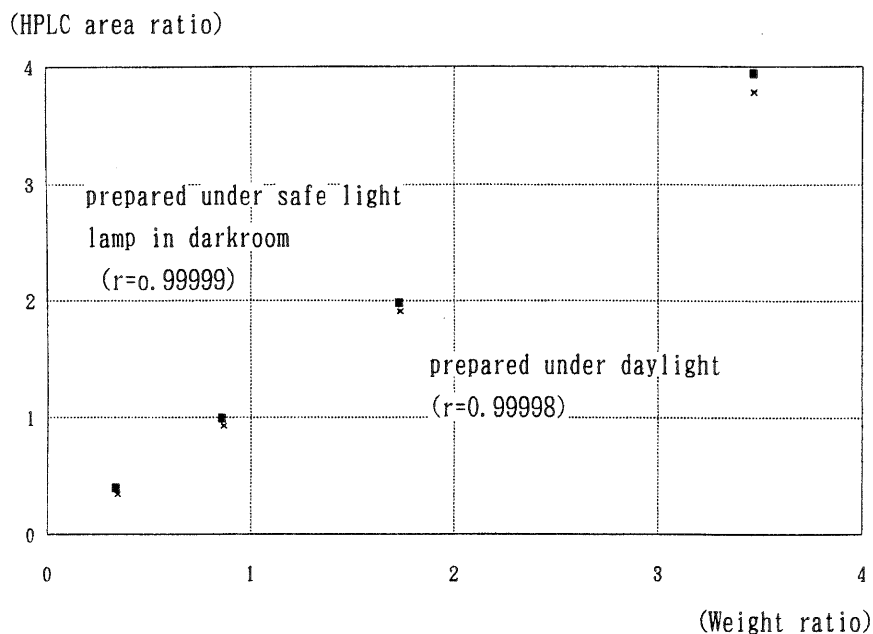


Fig 7 Calibration Curves of Chlordiazepoxide prepared under daylight or safe light lamp.

Table 7 Calibration of Chlordiazepoxide prepared under daylight or safe light lamp. Each injection volume : 10 μ l

Calibration of Chroldiazepoxide
(Prepared under daylight)

Conc of solution (mg/ml)		Weight ratio	HPLC area		HPLC Area ratio
CD	p-HEB	CD / p-HEB	CD	p-HEB	CD / p-HEB
0.01993	0.05744	0.34697	548297	1587070	0.34548
0.04982	0.05744	0.86734	1486020	1601522	0.92789
0.09964	0.05744	1.73478	3067637	1607062	1.90885
0.19928	0.05744	3.46936	6169415	1630674	3.78335

CD:Chlordiazepoxide

Calibration of Chroldiazepoxide
(Prepared under safe light lamp in darkroom)

Conc of solution (mg/ml)		Weight ratio	HPLC area		HPLC Area ratio
CD	p-HEB	CD / p-HEB	CD	p-HEB	CD / p-HEB
0.01954	0.05744	0.34018	613831	1566546	0.39184
0.04951	0.05744	0.86194	1519892	1542209	0.98553
0.09954	0.05744	1.73294	3086270	1560854	1.97730
0.19928	0.05744	3.46936	6370500	1617990	3.93729

(Calibration ratio)

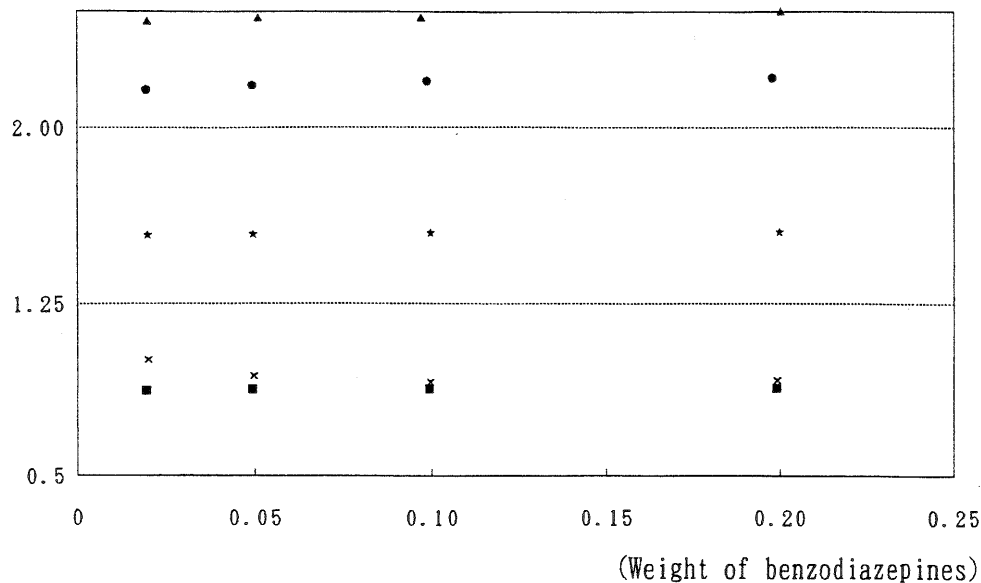


Fig 8 Ratios of one—standard calibration.

Table 8 Ratios of one—standard calibration. Each injection volume:10 μ l

	(Weight of benzodiazepines)	Weight ratio/area ratio
Alprazolam	▲ (0.02000)	2.4563
	(0.05013)	2.4706
	(0.09573)	2.4719
	(0.20048)	2.4983
Estazolam	● (0.01961)	2.1595
	(0.04957)	2.1796
	(0.19796)	2.2106
Diazepam	★ (0.01994)	1.5381
	(0.04975)	1.5422
	(0.20000)	1.5527
Chlordiazepoxide (daylight)	× (0.01993)	1.0043
	(0.19928)	0.9170
Chlordiazepoxide (dark room)	■ (0.01954)	0.8682
	(0.19928)	0.8812

4. 要 約

4種類のベンゾジアゼピン系向精神薬（アルプラゾラム、エスタゾラム、クロルジアゼポキシド、およびジアゼパム）の錠剤についてメタノール・水系の抽出液を用い、超音波により崩壊し手で振とうして抽出し、HPLC法により定量を試みた結果、いずれもほぼ表示成分量に近似した結果が得られた。

定量誤差を生じやすい点として、向精神薬成分によっては比

較的に光による影響を受けやすいものがあるので注意を要すること、また、試料採取の手法として錠剤をすりつぶしてその一部を量りとる方法では、吸湿または乾燥により成分量の変動が考えられるので適当でないことなどが挙げられる。

また、他のベンゾジアゼピン系向精神薬についても、適当な内部標準物質や移動相の条件を用いれば定量が可能と考えられる。

5. 謝 辞

今回の実験にあたりサンプル及び試料を提供くださいました
関係各位に深く感謝いたします。

6. 参考文献

- 1) 藤村徹, 秋枝毅, 猪間進: 本誌33, 65 (1994)
- 2) 秋枝毅, 猪間進: 本誌34, 65 (1995)
- 3) ベンゾジアゼピン系向精神薬の迅速分析法: 厚生省薬務局, 医薬品の迅速分析法について平成4年9月24日 薬監第49号
- 4) E. G. CClake: Isolation and Identification of Drugs; 1171 (1969)