Keywords
Correlation
Intensity

Spark emission spectrometry
Spectral line
Steel

高速液体クロマトグラフィーによるメクロフェノキサート 及び *p*-クロロフェノキシ酢酸の定量*

勝島 りえ子, 立沢 政義, 江島 昭**

(1978 年 3 月 31 日受理)

高速液体クロマトグラフィーにより, メクロフェノキサート及びその分解物である *p*-クロロフェノキシ酢酸の定量を行った. 固定相に日立ゲル 3011 及び 3011-O を用い, 移動相にそれぞれアセトニトリル-アンモニア水混液 (99.9:0.1), アセトニトリル-氷酢酸混液 (99:1) を選べば, メクロフェノキサートと *p*-クロロフェノキシ酢酸の分離定量が可能であった. 内部標準物質にマレイン酸クロロフェニラミン及びプロチジン酸を用い, ピーク高さ比により検量線を作成すると原点を通る直線が得られ, 定量値の再現性も良好であった.

メクロフェノキサートがメタノール中では水溶液中よりも急速に分解することを見いだした. このメタノール中の分解物を単離し, NMR, IR スペクトルにより *p*-クロロフェノキシ酢酸のメチルエステルと同定した.

1 緒 言

塩酸メクロフェノキサート (以下 Mc と略記) は脳代謝機能賦活剤として, 頭部外傷による意識障害, 脳出血の後遺症などの治療に使用されている薬物である¹⁾. Mc は, *p*-クロロフェノキシ酢酸 (以下 PAA と略記) と 2-ジメチルアミノエタノールのエステルであり, 加水分解して PAA を生ずる²⁾³⁾ (Fig. 1). 従来の方法では Mc はアルカリで加水分解した後中和滴定により定量され⁴⁾, 分解物の PAA はエーテルで分離抽出した後水酸化ナトリウムによって滴定して定量されていた⁴⁾. 著者らはこれらの物質の高速液体クロマトグラフィーによる簡易定量法を検討し, 日立ゲル 3011, 3011-O を固定相としアセトニトリルを移動相とする方法を見いだしたので報告する. 更に Mc がメタノール溶液状態で急速に分解し, 水溶液中の分解物である PAA と異なる物質

Fig. 1 Hydrolysis of Mc to PAA

を生ずることを見いだしたので, この分解物についても検討した.

2 試薬及び装置

2.1 試 薬

メタノール (特級), アセトニトリル (特級), 氷酢酸 (特級), 28% アンモニア水 (特級), Mc 及び PAA は富山化学製, プロチジン酸 (以下 Pr と略記) は持田製薬製, マレイン酸クロロフェニラミン (以下 Cp-Mal と略記) は局方品, Mc の製剤は市販品を用いた.

* 高速液体クロマトグラフィーによる新医薬品の分析 (第 1 報)

** 国立衛生試験所薬品部: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

2.2 装置

高速液体クロマトグラフのカラムは、日立ゲル 3011 (ポリスチレン-ジビニルベンゼンコポリマー)、日立ゲル 3011-O (日立ゲル 3011 にヒドロキシメチル基を導入したもの) を内径 3 mm, 長さ 50 cm のガラスカラムに充てんしたものを用いた。ポンプは協和精密社製 (流量 0~5 ml/min), 検出器は日本精密科学社製 NS-310 型 UV 検出器 {測定波長 (220~350) nm} を用いた。

3 実験

3.1 分離条件の検討

Mc と PAA の分離条件を決定するために、固定相に日立ゲル 3011, 3011-O を選んで検討した。移動相は最初はメタノールを用いたが、後述する (4.1) 安定性の検討の結果より、アセトニトリルを用いることにした。移動相として、(I) アセトニトリル-28% アンモニア水混液 (99.9:0.1) (II) アセトニトリル-氷酢酸混液 (99:1) を用いた。Mc はアセトニトリルにやや溶けにくいので、抽出その他の操作には、より溶解の速やかな移動相 (II) を用いた。

日立ゲル 3011 と移動相 (I) を組み合わせると Mc と PAA はよく分離するが、PAA は固定相にほとんど保持されずに溶出するので錠剤フィルムなどの酸性物質による妨害の可能性がある、PAA の定量には適当でないと思われる。3011-O と移動相 (II) を用いると、PAA は Mc の後から溶出し両者は良く分離した。3011 と移動相 (II) 又は 3011-O と移動相 (I) を用いると、Mc と PAA の分離は良くない。従って、Mc の定量には Cp-Mal を内部標準として 3011 と移動相 (I) を用いる第 (I) 法と、Pr を内部標準とし 3011-O と移動相 (II) を用いる第 (II) 法を選択した。第 I 法ではマレイン酸が Mc よりも早く溶出するが、PAA と重なっているので、後の Cp のピークを内部標準として用いる。PAA の定量には第 II 法が適当である。Fig. 2 に第 I 法と第 II 法によるクロマトグラムを示す。

3.2 標準溶液の調製

Mc を移動相 (II) に溶かし 2.5 mg/ml としたものを Mc 標準溶液原液とする。標準溶液原液 5 ml に内部標準溶液 5 ml 及びアセトニトリルを加えて 25 ml としたものを標準溶液とする。PAA の標準溶液原液は、PAA を移動相 (II) に溶かして 0.5 mg/ml とし、標準溶液 5 ml に内部標準溶液 1 ml とアセトニトリルを加えて 25 ml とした液を標準溶液とする。

Fig. 2 Liquid chromatograms of Mc and PAA

I—1: maleic acid and PAA, 2: Mc, 3: Cp (internal standard), column: Hitachi gel 3011 (50 cm × 3 mm i.d.), eluent: CH₃CN-28% NH₃ (99.9:0.1), flow rate: 1.0 ml/min, detector: 280 nm; II—1: Mc, 2: Pr (internal standard), 3: PAA, column: Hitachi gel 3011-O (50 cm × 3 mm i.d.), eluent: CH₃CN-AcOH (99:1), flow rate: 1.0 ml/min, detector: 280 nm

3.3 内部標準溶液の調製

第 I 法の内部標準溶液は Cp-Mal をアセトニトリルに溶かし 10 mg/ml とする。第 II 法では、Pr をアセトニトリルに溶かし 12.5 mg/ml としたものを内部標準溶液とする。

3.4 試料溶液の調製

3.4.1 Mc の試料溶液 Mc 錠 20 個以上を粉碎し、Mc 25 mg に相当する量を採り、移動相 (II) を加えて抽出し抽出液を合わせ内部標準溶液 10 ml を加えて全量 50 ml としたものを試料溶液とする。

3.4.2 PAA の試料溶液 1% 程度の PAA を含んでいる錠剤の定量には、Mc 200 mg に相当する量を採り、移動相 (II) 10 ml を加えて振とうし、遠心分離した後上澄液 5 ml に内部標準溶液 0.4 ml 及びアセトニトリルを加え全量 10 ml としたものを試料溶液とする。多量の PAA を含んでいる場合には最終的に約 0.1 mg/ml の濃度になるようにひょう取量を調整する。

3.5 検量線の作成

種々の濃度の Mc 又は PAA と内部標準物質を含む液を調製し, その 5 μ l をカラムに注入し, 移動相流速 1.0 ml/min, 検出器波長 280 nm で得られたクロマトグラムよりピーク高さ比を求め検量線を作成する. Mc については (0.1~1.0)mg/ml の範囲の 6 点の測定から, 相関係数 0.9998 の原点を通る直線となった. PAA については (0.01~0.15)mg/ml の範囲で相関係数は 0.9999 (6 点) の直線となった.

3.6 市販製剤の定量

標準溶液, 試料溶液の 5 μ l をカラムに注入し, 得られたクロマトグラムからピーク高さ比により含量を計算する. 流速, 検出波長はそれぞれ 1.0 ml/min, 280 nm である. Table 1 に市販製剤 (tablet A), 及び室温に長期保存して Mc の分解が進んでいるもの (tablet B) の定量結果を示す. 同一の試料を 5 回測定したときの R. S. D. (relative standard deviation) は 1% 程度で再現性良い方法と考えられる. tablet B 中の PAA を Mc $\cdot$ HCl 量に換算すると 32.95 となり, 残存 Mc 量との合計はほぼ 100% でクロマトグラム上に他のピークも見られないので, 他の分解物は存在するとしても微量と考えられる.

Table 1 Determination of Mc and PAA in commercial Mc preparations

	Tablet A			Tablet B	
	Method I	Method II		Method I	Method II
	Mc (%)	Mc (%)	PAA (%)	Mc (%)	PAA (%)
1	98.74	99.91	1.153	67.50	20.35
2	99.91	98.57	1.106	66.06	21.07
3	98.55	98.39	1.106	66.81	21.28
4	97.33	99.10	1.142		
5	97.39		1.134		
Mean	98.38	98.51	1.138	66.79	20.90†
R. S. D. (%)	1.07	0.46	1.78	1.08	2.33

† Equivalent to 32.95% of Mc

4 Mc の安定性

4.1 溶媒中での安定性

Mc が水溶液中で加水分解して PAA となることは既に知られているが²⁾³⁾, 本研究中 Mc のメタノール溶液を放置しておく急速に分解することが観測されたので, Mc の各種溶媒中における安定性を検討した. Mc を水, メタノール, エタノール, アセトニトリル, 移動相 (II) の溶液 (1 mg/ml) として約 20°C に保存し,

Mc の残存量を液体クロマトグラフィー (第 II 法) により経時的に測定した. その結果は Fig. 3 に示す. メタノール中では最も分解しやすく, アセトニトリル中では安定であった. 水中での分解物のピークは PAA と一致した. メタノール及びエタノール中の分解物は PAA よりも遅いブロードなピークとして現れ, 両者のリテンションタイムはほぼ等しく, 次の 4.2 の結果より PAA のメチル及びエチルエステルと考えられる.

Fig. 3 Stability of Mc in several solvents

—○— Water; —●— Methanol; —△— Ethanol;
—□— Acetonitrile and eluent II

4.2 メタノール中の分解生成物の確認

メタノール中の分解物の単離同定を試みた. Mc のメタノール溶液 (3 mg/ml, 500 ml) を室温に放置しておき, 液体クロマトグラフィーにより分解状況を追跡した. 2 週間後, 約 90% が分解し, 単一の分解物ピークが得られたので, メタノールを留去し油状物とわずかの結晶を得た. この結晶は残存している Mc と考えられるので, 分解物のみを単離するために酢酸エチルに溶かし, Mc の結晶をろ過して除く. このろ液から酢酸エチルを留去して得られた残さについて, IR スペクトル, NMR スペクトルを測定した. スペクトルを Fig. 4, Fig. 5 に示す.

IR スペクトルは臭化カリウム錠剤法で測定した. Fig. 4 中に PAA のスペクトルを破線で示した.

Fig. 4 Infrared spectra of the degradation product of Mc in methanol and PAA

— The degradation product in methanol; ---- PAA

Fig. 5 NMR spectrum of the degradation product of Mc in methanol

1760 cm^{-1} にカルボニルの $\text{C}=\text{O}$ 伸縮と考えられる吸収があるが, PAA のカルボン酸 $\text{C}=\text{O}$ 伸縮の吸収 1730 cm^{-1} よりも高波数にあり, エステルの $\text{C}=\text{O}$ と帰属できる. 1600 cm^{-1} 付近, 800 cm^{-1} 付近 にはそれぞれベンゼン環の $\text{C}=\text{C}$ 伸縮, $\text{C}-\text{H}$ 面外変角のバンドが観測される. CH 変角振動領域{(1500~1300) cm^{-1} }に, PAA には存在しない 1390 cm^{-1} の吸収が見られるが, これはメチル基の変角振動と考えられる.

NMR スペクトルは重クロロホルム溶液とし, TMS を内部標準として測定した. 3.8 ppm の鋭い単一ピークはメトキシ基のシグナルに帰属できる. (6.6~7.3) ppm の多重線は *p*-置換ベンゼン環のプロトンのパターンを示している. 4.6 ppm の単一ピークは, 積分曲線よりプロトン 2 に対応しておりメチレン基と考えられるが, 分裂がなくかなり低磁場にあることから, 隣接水素を持たずしゃへいも弱いと考えられる. 以上のことからこの物質は PAA のメチルエステルであると同定した.

5 結 語

高速液体クロマトグラフィーによる Mc と PAA の定量法を確立し, 製剤中の PAA の迅速定量が可能となった. 又, Mc がメタノール溶液中で急速に分解することを見だし, 分解物を単離して IR, NMR スペクトルを測定し PAA のメチルエステルと同定した.

文 献

- 1) V. Vich : *Prakt. Lakar.*, **50**, 257 (1970).
- 2) I. Grabowska : *Acta Polon. Pharm.*, **27**, 23 (1970).
- 3) E. Pandula, S. Tarjanyi, P. Keseru : *Acta Pharm. Hung.*, **42**, 214 (1972).
- 4) 医薬品の規格および試験法, 44 (昭和 46 年).

☆

Determination of meclofenoxate and *p*-chlorophenoxyacetic acid by high-speed liquid chromatography. Rieko KATSUSHIMA, Masayoshi TATSUZAWA and Akira EJIMA (National Institute of Hygienic Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo)

Meclofenoxate hydrochloride (Mc) is easily hydrolyzed to *p*-chlorophenoxyacetic acid (PAA), so that a rapid and selective method is required for quantitative determination of PAA in Mc preparations. In this paper, a high-speed liquid chromatographic method of Mc and PAA analysis is established. PAA was separated from Mc on a column packed with Hitachi-gel 3011 (styrene-divinylbenzene copolymer) by elution with acetonitrile-28% ammonia water mixture (99.9:0.1) (method I), and on a Hitachi-gel 3011-O (hydroxymethylated styrene-divinylbenzene copolymer) by elution with acetonitrile-acetic acid (99:1) mixture (method II). Chlorpheniramine maleate was used as an internal standard for method I, and protizic acid was used for method II. They were detected by UV absorption at 280 nm. Quantitative analysis of Mc is performed in both method I and method II, but for the determination of PAA method II is preferred. These methods are rapid, selective and sensitive for the analysis of Mc preparations. The authors also studied a stability of Mc in several solvents and found that Mc rapidly degrades in methanol solution and that the degradation product in methanol was different from PAA which is the degradation product of Mc in water. This unknown product was isolated and identified as methylester of PAA by IR and NMR spectra.

(Received Mar. 31, 1978)

Keywords

p-Chlorophenoxy acetic acid
High-speed liquid chromatography
Meclofenoxate