[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
— 一般論文 —
15(5) 340—346 (1989)

製剤中のニトロプルシドナトリウム定量法に関する検討

—直接吸光度法, スルフィド法, 高速液体

クロマトグラフ法についての検討—

坂本達一郎^{*1}, 河原崎貴伯^{*2}, 池田英夫^{*2}, 鈴木崇代^{*3}, 森谷 基^{*3},

岩本弘行^{*4}, 加藤善久^{*4}, 佐藤正基^{*4}, 木村良平^{*4}

静岡県立病院養心荘薬剤室^{*1}, 静岡県立総合病院薬剤部^{*2}

静岡県立こども病院薬剤室^{*3}, 静岡県立大学薬学部^{*4}

Studies on Assay Procedures for Sodium Nitroprusside in the Pharmaceutical Preparations

—Estimation of Direct Spectrophotometric Method, Sulfide Method
and High-performance Liquid Chromatographic Method—

TATSUICHIRO SAKAMOTO^{*1}, YOSHINORI KAWARAZAKI^{*2},

HIDEO IKEDA^{*2}, TAKAYO SUZUKI^{*3}, MOTOSHI MORIYA^{*3},

HIROYUKI IWAMOTO^{*4}, YOSHIHISA KATO^{*4},

MASAKI SATO^{*4}, and RYOHEI KIMURA^{*4}

Department of Pharmacy, Shizuoka Prefectural Hospital, Yoshino^{*1}

Department of Pharmacy, Shizuoka General Hospital^{*2}

Department of Pharmacy, Shizuoka Children's Hospital^{*3}

School of Pharmaceutical Science, University of Shizuoka^{*4}

(Received May 29, 1989)

The evaluation of methods for quantitative analysis of sodium nitroprusside (SNP), a potent hypotensive agent, is described. The direct spectrophotometrical method described by M. J. Frank et al., which has been employed as a conventional method in the hospital had a liability to overestimate the degradation of SNP. The high-performance liquid chromatographic method reported by O. R. Leeuwenkamp et al., with some modification gave accurate value and showed two peaks on chromatogram assignable to degradation products. The sulfide method reported by C. J. Vesey and G. A. Batistoni was thought to be a simple and convenient method for the quantitative estimation of degradation of SNP.

Photodegradation was dependent upon the concentration of SNP. Higher degradation rate was observed in lower concentration. The difference in the extent of degradation was not found for solvents used, distilled water, 5% glucose solution and 0.9% saline solution. The degradation of an aqueous solution of SNP stored in a cool and dark place for 13 months was not observed.

Keywords—sodium nitroprusside; assay method; photodegradation

^{*1} 静岡市与一右衛門新田335; 335, Yoichiemon-shinden, Shizuoka, 420 Japan

^{*2} 静岡市北安東4丁目27-1; 4-27-1, Kitaando, Shizuoka, 420 Japan

^{*3} 静岡市漆山860; 860, Urushiyama, Shizuoka, 420 Japan

^{*4} 静岡市谷田395; 395, Yada, Shizuoka, 422 Japan

はじめに

ニトロブシドナトリウム (SNP) は、鉄原子に5つのシアノ基と1つのニトロシル基の配位した錯化合物である。SNP は生体に適用した場合血管平滑筋に直接作用し、動・静脈拡張作用を有する薬物で、現在うっ血性心不全や重篤な高血圧症の治療や麻酔時の低血圧維持などに血圧降下剤として使用されている。わが国ではその市販製剤はなく、医師の処方せんに従って院内製剤（主として注射剤）として調製・供給されている。

SNP 水溶液は特に光に対して不安定なため、製剤上、保存上および使用上、その安定性について関心がもたれ、数多くの報告¹⁻⁷⁾がなされているが、それらの大半は SNP の定量法として 394nm の吸光度変化を利用した Frank ら¹⁾の方法 (OD₃₉₄ 法) を用いたものである。しかしこの方法では SNP の光分解物も同一波長に強い吸収を示すため、SNP の分解を正確に把握できないことが最近指摘されるようになり⁸⁾、この SNP 製剤の品質を管理する上でひとつの問題点となってきた。一方、これ以外の定量法として、Vesey ら²⁾の硫化ナトリウムを用いる方法 (スルフィド法) や Leeuwenkamp ら^{7,9)}の高速液体クロマトグラフによる方法 (HPLC 法) が報告されている。

今回著者らは製剤中 SNP の正確かつ簡便な定量法を見出すために、SNP を直接分離・定量するという点で正確性の高い HPLC 法を基準として、OD₃₉₄ 法とスルフィド法とを比較検討した。

実験方法

1. 試料

SNP は和光純薬特級を、リン酸テトラブチルアンモニウムは半井化学製品イオンペアークロマト用を、その他の試薬は市販特級品および液体クロマトグラフィー用を用いた。

2. SNP 溶液の調製

溶媒として精製水、5%ブドウ糖液および生理食塩液を用い、SNP 20mg/ml 溶液を調製した。次にこの溶液を各溶媒で適宜希釈することによって、0.2ないし2 mg/ml 溶液を調製した。なおこれらの調製は暗室内赤色光下で行った。

3. 光照射実験

光源として主に東芝電池 (株) 製白色フォトリフレクタランプ (300W; 照度 2500または 7000Lux) を用い、他に白色蛍光灯 (15W, 2本; 照度 2530Lux), 太陽拡散光 (晴天日の日かげ; 照度 3000~9500Lux) を用いて、

三角フラスコ内 SNP 溶液への光照射を行った。人工灯を用いる場合は暗室内で実験を行った。

4. SNP の測定法

光照射開始後、経時的に上記の試料溶液を分取し、SNP を下記の方法に従って測定した。

OD₃₉₄ 法: 文献¹⁾記載の方法に従い試料溶液の 394nm における吸光度を測定し、モル吸光係数を求め、次式¹⁾から SNP 残存率を算出した。

$$\text{残存率(\%)} = 100 - \frac{\text{モル吸光係数} - 20.4}{0.8}$$

スルフィド法: 文献²⁾記載通りに行った。すなわち、0.1M エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 1.5ml およびスルフィド試液 (0.8% Na₂S · 9H₂O, 5 × 10⁻³% NH₂-NH₂ · H₂SO₄, 2%NaOH; 用時調製) 1.0ml の混液に試料溶液 1.0ml を添加・混和し、暗所に10分間静置した。ついで 540nm における吸光度を測定し、光照射前の吸光度を 100% として各採取時間の残存率を算出した。

HPLC 法: 文献^{7,9)}記載の方法を若干改変し次に示す条件で測定した。装置、東洋曹達 SP-8700; 検出器、東洋曹達 UV-8 model II (検出波長, 220nm); カラム, μ-Bondapak phenyl 結合型 (4mm × 250mm); 移動相, メタノール-10mM KH₂PO₄(pH 7.0) [35: 65, 5mM リン酸テトラブチルアンモニウム含有]; 流速, 1.0ml/min; 試料溶液注入量, 20μl。残存率は光照射前のピークの高さを 100% として、各測定時間のピークの高さから計算した。

結果及び考察

1. 光照射による SNP の変化

1) 3種類の測定法の比較

光源として白色フォトリフレクタランプを用い、照度 2500Lux において SNP 0.2mg/ml (点滴使用濃度) 精製水溶液に光照射を行った。Fig. 1 は、照射開始時 (0時間)、照射後 4 および 12 時間の試料溶液について SNP の測定を行った場合の OD₃₉₄ 法とスルフィド法による各吸収スペクトル、および HPLC 法によるクロマトグラムを示したものである。OD₃₉₄ 法では時間経過に伴って 394nm における吸収が増大し、スルフィド法では 540nm の極大吸収が低下し、また HPLC 法においては保持時間16分の SNP ピークが減少するのが認められた。これらの変化は光照射によって SNP が分解したことを示している。

なお、HPLC 法においてクロマトグラム上 2.8, 4.4 分の位置に光分解物によると考えられる 2つのピークが出

Fig. 1. Comparison of Assay Procedures for Photo-irradiated SNP in Distilled Water

SNP solution: initial concn. of 0.2mg/ml in a volume of 250ml.

Photo-irradiation: photoreflexor lamp (300W), 2500Lux.

Fig. 2. Time Course of Photodegradation of SNP in Distilled Water

Experimental condition: the same as described in Fig. 1.

Each point: mean for 3 experiments.

Control (foil-wrapped, 12hr): a) 98.1%; b) 100.3%; c) 101.3%.

現し、これらは時間と共に増加した。

2) 3種類の溶媒中における経時変化

Fig. 2は上記実験におけるSNP残存率を経時的にプロットしたものである。OD₃₉₄法による測定では、SNPの減少程度はHPLC法によるそれと比較して顕著に大きく、6時間後には残存率が約-20%と計算上0%以下となった。一方、スルフィド法によって求めたSNP残存率はHPLC法の場合とほぼ同じ変化を示し、6時間

後で約90%、12時間後でも80%以上の値を示した。なお、アルミホイルで遮光した対照溶液においては測定法に関係なくほとんど変化が認められなかった。

次に、5%ブドウ糖液および生理食塩液をSNP溶媒として用いて上記と同様な実験を行った。その結果をFig. 3に示すが、SNP残存率の経時パターンはFig. 2のそれぞれに対応するパターンとほとんど類似するものであった。すなわち、いずれの溶媒中においてもOD₃₉₄

Fig. 3. Time Course of Photodegradation of SNP in 5% Glucose and 0.9% Saline Solutions

Experimental condition: the same as described in Fig. 1 except that 5% glucose and 0.9% saline solutions were employed as solvents.

Each point: mean for 2—3 experiments.

Table 1. Photodegradation Rate of SNP in Distilled Water, 5% Glucose Solution and 0.9% Saline Solution

	Solvent	Equation of regression line ^{a)}	$r^b)$	$k^c)$ (hr ⁻¹)
OD ₃₉₄ method	Water	$Y = -45.1 \times 10^{-2} X + 4.73$	-0.983 (p<0.05)	45.1×10^{-2}
	Glucose soln.	$Y = -38.0 \times 10^{-2} X + 4.70$	-0.988 (p<0.05)	38.0×10^{-2}
	Saline soln.	$Y = -51.2 \times 10^{-2} X + 4.96$	-0.942 (p<0.05)	51.2×10^{-2}
Sulfide method	Water	$Y = -1.77 \times 10^{-2} X + 4.59$	-0.976 (p<0.01)	1.77×10^{-2}
	Glucose soln.	$Y = -2.05 \times 10^{-2} X + 4.59$	-0.990 (p<0.01)	2.05×10^{-2}
	Saline soln.	$Y = -2.16 \times 10^{-2} X + 4.58$	-0.988 (p<0.01)	2.16×10^{-2}
HPLC method	Water	$Y = -1.98 \times 10^{-2} X + 4.61$	-0.997 (p<0.01)	1.98×10^{-2}
	Glucose soln.	$Y = -1.86 \times 10^{-2} X + 4.62$	-0.997 (p<0.01)	1.86×10^{-2}
	Saline soln.	$Y = -1.65 \times 10^{-2} X + 4.61$	-0.988 (p<0.01)	1.65×10^{-2}

a) Y, ln (residual percent of SNP); X, irradiation time(hr).

b) Correlation coefficient.

c) First-order rate constant.

法では SNP 残存率の減少は他の 2 法の場合に比べて著しく大きく、ある一定時間以降は残存率が計算上 0 % 以下となった。またスルフィド法および HPLC 法ではおのの同程度の变化を示した。

3) SNP の光分解反応速度

以上の SNP 残存率の経時推移から判断して、その光分解反応を一次反応と仮定し、各測定法ごとにそれぞれの溶媒における反応速度定数 k を算出した (Table 1)。

その結果、いずれの測定法においても溶媒間で k 値に明らかな差は認められなかった。すなわち、SNP は精製水、5%ブドウ糖液および生理食塩液中においてほぼ同じ速度で光分解を受けることが明らかになった。このことから以下の実験では溶媒には精製水を用いた。また、 k 値を測定法間で比較するとスルフィド法と HPLC 法はほぼ近似した値をとるのに対して、OD₃₉₄ 法はそれら 2 法より約 20~30 倍高い値を示した。このことは OD₃₉₄

法による測定では SNP の光分解反応を過大に見積ってしまうことを示唆している。

2. 各種濃度における SNP の光分解

SNP の光分解に対する SNP 濃度の影響を検討した。0.2, 2 および 20mg/ml (3 番目は製剤調製時濃度) の 3 種類の濃度を用いて, Fig. 1 と同一条件で光照射を行った。結果を Fig. 4 に示す。各測定法とも濃度が高くなると SNP 残存率の減少程度が小さくなった。OD₃₉₄ 法では HPLC 法の場合と比較して, 3 種類の濃度とも残存率の減少割合は著しく大きかった。

一方, スルフィド法による場合は SNP は 8 時間後まで HPLC 法の場合と同程度の変化を示したが, 12 時間後では高濃度 (2 および 20mg/ml) の残存率が 8 時間のそれよりも高くなった。これは SNP と構造の類似した分解物がスルフィド試液と反応し, 540nm に吸収をもつ発色物質を生成したためと考えられるが, 確かな原因はわからない。また, HPLC 法で測定した場合に 20 mg/ml の濃度では 12 時間後の残存率が 99.5% と高い値を示したことは, SNP は高濃度下においては非常に変化を受け難いことを示している。

3. SNP の光分解に対する光源の影響

白色フォトリフレクタランプによる照度を 7000Lux に

高めた場合, また光源を白色蛍光灯 (照度約 2500Lux) に変更した場合について, SNP の光照射による変化を経時的に調べた。SNP 溶液は 0.2 および 20mg/ml の濃度のものを用いた。これらの結果を Table 2 に示す。

高照度下において低濃度の SNP 溶液では, OD₃₉₄ 法による測定の場合 2 時間後にはすでに残存率が 0% 以下となったのに対して, スルフィド法および HPLC 法では同程度の残存率を示し, 2 時間後で約 85%, 12 時間後で約 55% であった。高濃度溶液においてはいずれの測定法でも低濃度の場合に比較して SNP の減少程度は小さくなるが, この濃度の場合も OD₃₉₄ 法は他の 2 つの方法より大きな減少割合を示した。白色蛍光灯による実験においても上記と同様な結果が得られ, 高濃度, 低濃度のいずれの場合にも OD₃₉₄ 法による測定では SNP の変化がスルフィド法, HPLC 法より大きく現れ, 後の 2 つの方法では変化は同程度であった。

室内で太陽拡散光を光源した場合の実験結果を Table 3 に示す。測定時の照度を表中に示した。この実験においても SNP 0.2mg/ml 溶液の場合, OD₃₉₄ 法では 30 分後にはすでに 90% 以上の減少を, また 1 時間以降では計算上 100% 以上の減少を示し, 他の 2 つの方法では OD₃₉₄ 法の場合に比較してごく小さな変化であり, またおのお

Fig. 4. Photodegradation of SNP at Various Concentrations in Distilled Water

Experimental condition: the same as described in Fig. 1 except that various concns. of SNP were added.

Each point: mean for 2—3 experiments.

Table 2. Effect of Photo-irradiation with Photoreflector and Fluorescent Lamps on SNP in Distilled Water

Light source	Irradiation time (hr)	Residual percent of SNP					
		0.2 mg/ml SNP			20 mg/ml SNP		
		OD ₃₉₄ method	Sulfide method	HPLC method	OD ₃₉₄ method	Sulfide method	HPLC method
Photoreflector lamp (300 W, 7000 Lux)	0	100	100	100	100	100	100
	1	37.7	92.3	94.6	94.4	—	—
	2	- 12.7	83.3	87.5	89.6	93.7	99.1
	4	-106.7	74.7	80.6	79.3	94.7	99.1
	8	-334.8	59.5	63.7	63.3	88.9	98.1
	12	-434.4	53.6	57.4	51.2	85.3	98.4
Fluorescent lamp (15 Wx2, 2530 Lux)	0	100	100	100	100	100	100
	2	36.6	—	—	96.1	—	—
	4	- 16.5	86.4	90.1	91.6	98.4	98.1
	8	- 96.6	78.4	83.1	83.7	94.4	99.3
	12	-166.4	72.2	77.3	76.1	94.6	99.4

SNP solution: volume of 200 ml.
Each value: mean for 2 experiments.

Table 3. Effect of Diffuse Daylight on SNP in Distilled Water

Irradiation time (hr)	Illumination (Lux)	Residual percent of SNP					
		0.2 mg/ml SNP			20 mg/ml SNP		
		OD ₃₉₄ method	Sulfide method	HPLC method	OD ₃₉₄ method	Sulfide method	HPLC method
0	3030	100	100	100	100	100	100
0.5	4660	7.8	84.4	—	92.5	95.3	—
1	5050	- 67.7	76.9	84.2	87.4	95.3	—
2	6400	-337.7	70.5	74.6	76.6	94.5	97.3
4	9500	-683.2	69.0	63.7	64.3	91.3	97.0
6	7360	-933.6	—	—	56.5	—	—
8	9170	-1053.7	60.9	50.5	52.7	88.3	95.6

SNP solution: volume of 200 ml.
Each value: mean for 2 experiments.

Table 4. Stability of SNP Stock Solution Prepared with Distilled Water

	Residual percent of SNP		
	OD ₃₉₄ method	Sulfide method	HPLC method
1% SNP	99.1	98.9	100.1
2% SNP	99.8	100.9	99.9

SNP solution: stored at 4°C for 13 months in the dark.

の同程度であった。20mg/ml の濃度においても、OD₃₉₄ 法では他の2つの方法より SNP 残存率の減少割合は大きく現れた。

4. SNP 保存溶液の安定性

Table 4 は SNP の 10mg/ml および 20mg/ml 溶液

を13か月間冷暗所に保存した場合の SNP の安定性を OD₃₉₄ 法、スルフィド法、HPLC 法で調べた結果である。いずれの測定法によっても SNP 残存率はほぼ100%であり、この保存条件においては SNP はほとんど変化を受けないことが示された。

以上の実験結果から、HPLC 法を基準にすると、SNP の溶解に用いる溶媒やその濃度範囲、また光源の種類や照度に関係なく、OD₃₉₄ 法は SNP の光分解を過大評価する恐れのある測定法であることが明らかになった。しかし OD₃₉₄ 法はその感度の高さから SNP の分解の有無に関する定性的判断には十分に適用できるものと考えられる。

一方、スルフィド法は SNP のある特定濃度範囲内において、その変化を HPLC 法とほぼ同様な変化として

捕らえることができることから、この方法はある限定された SNP の濃度域において正確かつ簡便で経済的な測定法として使用でき、院内 SNP 製剤の調製時、保存時および使用時の品質管理上に有用な測定法であるといえる。実際に13カ月間冷暗所に保存した SNP 溶液の安定性を本法を用いて調べたところ、SNP は全く安定であることが示された。しかし、高濃度下において SNP の分解が進んだときに残存率の増加する原因については今後検討の必要があると考えられる。

従来 SNP の安定性について多くの報告は OD₃₉₄ 法による測定結果をもとに論じられているが、本実験結果のもとについて考えると、光による SNP の分解は過大に見積られていた可能性がある。

引 用 文 献

- 1) M. J. Frank, J. B. Johnson and S. H. Rubin, *J. Pharm. Sci.*, **65**, 44-48 (1976).
- 2) C. J. Vesey and G. A. Batistoni, *J. Clin.*

Pharm., **2**, 105-117 (1977).

- 3) 瀬戸 貢, 関 京子, 武井婦美恵, 村瀬勢津子, 島田慈彦, 朝長文弥, 神病薬誌, **36**, 30-32 (1980).
- 4) 鶴岡道雄, 橋本 強, 一政清一, 瀬尾 量, 九州薬学会会報, 第34号, 43-48 (1980).
- 5) 河原崎貴伯, 鈴木崇代, 角入寿彦, 竹之内敏弘, 池田英夫, 坂本達一郎, 医薬ジャーナル, **18**, 445-447 (1982).
- 6) W. P. Arnold, D. E. Longnecker and R. M. Epstein, *Anesthesiology*, **61**, 254-260 (1984).
- 7) O. R. Leeuwenkamp, E. J. Van der Mark, W. P. Van Bennekom and A. Bult, *Int. J. Pharmaceut.*, **24**, 27-41 (1985).
- 8) O. R. Leeuwenkamp, W. P. Van Bennekom, E. J. Van der Mark and A. Bult, *Pharm. Weekbl. Sci. Ed.*, **6**, 129-140 (1984).
- 9) O. R. Leeuwenkamp, E. J. Van der Mark, P. M. Van der Klauw, W. P. Van Bennekom and A. Bult, *Anal. Chim. Acta*, **161**, 211-219 (1984).

劇 胆汁分泌促進剤

薬価基準収載品

スルファレム錠

アネトールトリチオン 12.5mg/錠 含有

- 〔効能効果〕 下記疾患における利胆
胆道（胆管・胆のう）系疾患及び胆汁うっ滞を伴う肝疾患
- 〔用法用量〕 アネトールトリチオンとして通常成人1回25mgを1日3回経口投与
年令・症状により適宜増減

〔使用上の注意〕

- (1) 次の患者には投与しないこと
  - 1) 完全胆道閉塞のある患者
  - 2) 急性期の肝・胆道疾患のある患者
  - 3) 重篤な肝障害のある患者
- (2) 副作用
  - 1) 過敏症 ときにじん麻疹、発疹等の過敏症状があらわれることがあるので、このような症状があらわれた場合には投与を中止すること。
  - 2) 消化器 ときに下痢、軟便、腹痛、腹部膨満感、悪心、腹鳴等の症状があらわれることがある。

3) その他 ときに心悸亢進、顔面のぼせ感があらわれることがある。

- (3) 妊婦への投与
妊娠中の投与に関する安全性は確立していないので、妊婦又は妊娠している可能性のある婦人には投与しないことが望ましい。

(4) その他の注意
動物実験（ラット）において、人体常用量の400倍及び600倍相当量を腹腔内連続投与したとき、病理組織学的に甲状腺萎縮像が認められたとの報告があるので、使用にあたっては甲状腺機能に十分注意すること。

〔資料請求先〕 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター学術課
〒536 大阪市城東区森之宮2丁目3番30号

〔包 装〕 1,200錠 6,000錠
(PTP) 10錠×120 10錠×600
規制区分：劇 薬

製 造 東菱薬品工業株式会社
提 携 ラ テ マ 社 (フランス)

販 売 元

扶桑薬品工業株式会社