薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
116 (4) 329—334 (1996)

マレイン酸及びクロルフェニラミンの同時定量用のイオン対
クロマトグラフィーによる鎮咳感冒薬中のマレイン酸
クロルフェニラミンの定量分析

大和 進,* 酒井みゆき, 嶋田健次
新潟薬科大学

Quantitative Analysis of Chlorpheniramine Maleate in Cough
and Cold Drugs by Ion-Pair High-Performance Liquid
Chromatography for the Simultaneous Determination
of Chlorpheniramine and Maleate

Susumu YAMATO,* Miyuki SAKAI, and Kenji SHIMADA
*Niigata College of Pharmacy, 5-13-2 Kamishin'ei-cho,
Niigata 950-21, Japan*

(Received December 4, 1995)

A simple, rapid and convenient chromatographic method, which permits the simultaneous determination of chlorpheniramine (CP) and maleate (MA), recently developed by the authors was applied to the analysis of chlorpheniramine maleate (CPM) in cough and cold drugs. In this method, a Capcell Pak C₈ column and an isocratic mobile phase containing 15% methanol, 50 mM KH₂PO₄ and 5 mM tetra-*n*-butylammonium phosphate as an ion-pair reagent were used. By using the mobile phase adjusted to pH 3.0 with orthophosphoric acid, fumaric acid, MA, CP, acetaminophen (paracetamol), caffeine, and *m*- and *p*-hydroxybenzoic acid as candidates for an internal standard were eluted separately within 17 min. Detection was carried out with UV detector at 215 nm. Under the same conditions, five other antihistamines analogous to CPM were also separated. The calibration graphs for CP and MA showed good linearity in the range of 0.5—10 nmol (0.195—3.9 μg) per 20 μl injection, respectively. The proposed method was successfully applied to the simultaneous determination of CP and MA, *i.e.*, CPM analysis, in commercial cough and cold drugs which pharmaceutical forms were tablet, granule and syrups.

Key words—ion-pair high-performance liquid chromatography; tetra-*n*-butylammonium phosphate; chlorpheniramine maleate; cough-cold drug; antihistamine; simultaneous determination

マレイン酸クロルフェニラミン (CPM) は最も繁用されている抗ヒスタミン薬の1つで、種々の CPM 定量法が報告されている。¹⁻⁸⁾ 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた CPM 定量法は、オクタンスルホン酸などのアニオン性イオン対試薬を用いたイオン対クロマトグラフィーによるものである。⁹⁻¹¹⁾ これは CPM 中の弱塩基性部分のクロルフェニラミン (CP) に注目したもので、製剤中の CPM 分析法として報告されている。また、アニオン性とカチオン性のイオン対試薬を混合した系で、CPM を含む製剤中の各成分を一斉分析する試みもなされている。¹²⁾ これに対し、著者らはカチオン性イオン対試薬のリン酸テトラ-*n*-ブチルアン

モニウム (TBAP) を用いた CPM 定量法を報告した。¹³⁾ この方法は CPM 中の弱酸性部分のマレイン酸 (MA) と弱塩基性部分の CP を簡易・迅速に同時定量し得る HPLC で、純度及び確認試験の役割も果たすことから、CPM の品質評価のための分析法として有用であった。

著者らは今回、鎮咳感冒薬中の CPM 分析に対し本法の適用を試みたところ、溶離条件を選択することで応用が可能となったので報告する。また、市販の鎮咳感冒薬中の CPM 定量に適用したところ、興味ある結果を得たので併せて報告する。

実 験 の 部

1. 試薬及び標準溶液 CPM 及び類縁抗ヒスタミン薬はシグマ社製を用いた。 *m*-ヒドロキシ安息香酸 (*m*-HOBA) はアルドリッチ社製を、 *p*-ヒドロキシ安息香酸 (*p*-HOBA) は関東化学製を使用した。アセトアミノフェン (パラセタモール)、無水カフェイン、フマル酸 (FA) 及び MA は和光純薬工業製を用いた。メタノールは関東化学製の HPLC 用試薬特級品を、TBAP はナカライテスク製のイオン対試薬特級品を使用した。市販の鎮咳感冒薬は A 社の錠剤、B 社の顆粒剤、C, D, E 社のシロップ剤を購入して試料とした。標準溶液の調製は前報¹³⁾と同様に

Fig. 1. (A) Chromatogram of (1) Fumaric Acid ($2.5 \cdot 10^{-5}$ M), (2) Maleic Acid ($7.5 \cdot 10^{-5}$ M), (3) Chlorpheniramine ($7.5 \cdot 10^{-5}$ M), (4) *p*-Hydroxybenzoic Acid ($1 \cdot 10^{-4}$ M) and (5) *m*-Hydroxybenzoic Acid ($1 \cdot 10^{-4}$ M) and (B) Chromatogram of (1) Acetaminophen (Paracetamol), (2) Maleic Acid, (3) Chlorpheniramine, (4) Caffeine and (5) *m*-Hydroxybenzoic Acid

Sample concentrations were $5 \cdot 10^{-5}$ M. Column: Capcell Pak C₈ (150×6 mm i.d.); mobile phase, 50 mM KH₂PO₄, 5 mM tetra-*n*-butylammonium phosphate (TBAP) and 15% MeOH, pH 3.0; flow-rate, 1.0 ml/min; temperature, 30°C; detection, 215 nm, injection volume, 20 µl.

行った。

2. HPLC 装置及び測定方法 分析機器及び分離カラムは前報¹³⁾と同様に, HPLC ポンプ 島津 LC-6A, 紫外可視吸光分光検出器島津 SPD-6AV, 島津クロマトパック C-R4A 及び Cap-cell Pak C₈ (150×6 mm i.d., SG type, 5 µm particle, Shiseido) をそれぞれ用い, 分離カラムは島津カラムオープン CTO-6A 中で, 温度を 30°C に保った. HPLC 用の溶離液には, 15% MeOH を含む 5 mM TBAP と 50 mM KH₂PO₄ (pH 3.0) を用い, 前報¹³⁾と同様に調製した. 市販鎮咳感冒薬の分析においては分析用溶離液で 20 分間溶出して分析後, 45% MeOH を含む 5 mM TBAP と 50 mM KH₂PO₄ の洗浄用溶離液 (pH 3.0) で分離カラムを洗った. 20 分後, 再び分析用の溶離液でさらに 20 分間送液してから, 次の試料を注入した. この溶離液の切替えには島津システムコントローラー SCL-6A を用いた. 流速は 1.0 ml/min とし, 溶出液は波長 215 nm で測定した. その他については, 前報¹³⁾と同様に行った. 標準及び試料溶液はそれぞれ 20 µl を Rheodyne 7125 を用いて HPLC に注入して, ピーク面積 (mV·s) を求めた.

3. 試料溶液の調製 市販鎮咳感冒薬中の CPM 分析において錠剤及び顆粒剤では粉碎後, 表示量を参考にして一定量を精密に量り取り, 精製水を用いて検量線範囲内の濃度になるように調整後, 抽出した. シロップ剤では精製水を用いて適当な濃度に希釈した. 錠剤及び顆粒剤の抽出液は 2000 rpm で 15 分間の遠心分離をした上清を, シロップ剤では希釈液を, それぞれメンブランフィルター (5.0 µm) でろ過し, 試料溶液とした. HPLC 定量は試料溶液 20 µl を用いて行った.

結果 及び 考 察

1. 溶離液条件の検討

著者らが先の報告で用いた溶離液 (15% MeOH, 5 mM TBAP, 50 mM KH₂PO₄, pH 2.6) は, CPM の品質評価のための分析及び点眼薬中の CPM 定量には適当であった.¹³⁾ しかし, 鎮咳感冒薬中の CPM 分析に用いる場合, これらの製剤中に多く見られるアセトアミノフェン (パラセタモール, AP) 及び無水カフェイン (CF) の溶出ピークの妨害を受け, 適用できなかった. そこで著者らは今回, 前報¹³⁾において求めた CP, MA, FA, *m*-HOBA 及び *p*-HOBA の保持挙動についての詳細な検討結果を参考に, さらに精査した. その結果, 溶離液として 15% MeOH, 5 mM TBAP, 50 mM KH₂PO₄, pH 3.0 を

Fig. 2. Chromatogram of Antihistamines Analogous to Chlorpheniramine Maleate

Peaks: 1, pheniramine (maleate); 2, triprolamine (hydrochloride); 3, pyrilamine (maleate); 4, maleic acid; 5, chlorpheniramine; 6, carbinoxamine (maleate); 7, chlorpyramine (hydrochloride).

Sample concentrations were $1 \cdot 10^{-5}$ M and HPLC conditions were the same as in Fig. 1 without the injection volume of 15 µl.

用いるのが最適であった。Fig. 1A には、この溶離液組成の下で得られる典型的なクロマトグラムを示した。CPM 中に混在する可能性のある物質としての FA, 測定対象となる MA と CP, 及び内標準物質として妥当と思われる *m*-HOBA 及び *p*-HOBA が、17 分以内に溶出された。溶離液の pH を上昇させると CP の保持比は増す¹³⁾のに対し、AP 及び CF の保持比はほとんど変化しなかった。この溶離液組成の下で、MA と CP は AP 及び CF と良好な分離を示した (Fig. 1B)。それぞれの保持時間 (t_R) は 4.9 分 (FA), 6.9 分 (AP), 9.2 分 (MA), 10.7 分 (CP), 12.0 分 (CF) 及び 16.5 分 (*m*-HOBA) であった。*p*-HOBA は t_R 12.8 分で、CF との分離は不十分であった。したがって、この分離条件下で内標準法を用いて CPM 定量をする場合、内標準物質として *m*-HOBA の方が *p*-HOBA より適すると認めた。また、CPM に類似する抗ヒスタミン薬への応用を試みたところ、この溶離液は、5 種の抗ヒスタミン薬の相互分離も良好で、同時分析も可能であった (Fig. 2)。

2. 検量線と精度

この実験条件下で CPM の標準溶液を用いて絶対検量線を作成したところ、注入量 20 μ l の試料中に CPM の 0.5—10 nmol (0.195—3.9 μ g) を含む範囲で、良好な直線性を示した。試料量 (X : nmol) に対するピーク面積値 (Y : mV $\cdot$ s) として回帰式及び相関係数 (R) を求めたところ、MA は $Y=683.40X+0.91$, $R=0.9998$, CP は $Y=535.77X-27.72$, $R=0.9999$ であった。CPM の標準溶液 1 nmol/20 μ l 注入量を繰り返し測定して得た相対標準偏差は、MA と CP のいずれもが 2.0% 以内 ($n=6$) であった。

Fig. 3. Chromatograms of Sample Solutions Obtained from Commercially Available Cough and Cold Drugs

Pharmaceutical products of A—E were assayed using the same HPLC conditions shown in Fig. 1. Peaks: 1, maleic acid; 2, chlorpheniramine. The characters of A—E correspond to those shown in Table 1.

Table 1. Determination of Chlorpheniramine and Maleate in Commercial Cough and Cold Drugs

Sample	Composition	Labeled content	Found content (%) ^{a)}	
			Maleic acid	Chlorpheniramine
A (Tablet)	Chlorpheniramine maleate	6 mg/tablet	88.5	89.2
	Phenylephrine hydrochloride	3 mg/tablet		
	Phenylpropanolamine hydrochloride	34 mg/tablet		
	Datura extract	12 mg/tablet		
B (Granule)	Chlorpheniramine maleate	1.33 mg/g	97.8	98.0
	Dextromethorphan hydrobromide	6.67 mg/g		
	<i>dl</i> -Methylephedrine hydrochloride	8.33 mg/g		
	Crude glycyrrhiza extract	14 mg/g		
	Platycodon extract	6 mg/g		
C (Syrup)	Chlorpheniramine maleate	0.4 mg/ml	96.0	94.8
	Dihydrocodeine phosphate	1 mg/ml		
	Guaifenesin	5.56 mg/ml		
	Anhydrous caffeine	2.07 mg/ml		
D (Syrup)	Chlorpheniramine maleate	0.083 mg/ml	100.8	97.3
	Acetaminophen	10 mg/ml		
	Anhydrous caffeine	1.67 mg/ml		
E (Syrup)	Chlorpheniramine maleate	0.125 mg/ml	ND ^{b)}	102.3
	Tipecidine citrate	1.25 mg/ml		
	Plantago herb fluid extract	0.125 ml/ml		

a) Percent of the found content to the labeled content, mean ($n=3$); b) ND, not detected.

3. 市販鎮咳感冒薬の定量

市販鎮咳感冒薬の13種類について、本法によりMAとCPの定量を行った。その結果、錠剤と顆粒剤の各1例及びシロップ剤の3例について、Fig. 3に示すようなクロマトグラムが得られた。AP及びCFを含有しない製品 (Fig. 3A, B) では、問題なく定量でき、CFあるいはAPとCFを含有する製品 (Fig. 3C, D) でもCPMに対する重量比で、120倍程度のAP及び20倍程度のCFを含有する製品では定量可能であった。しかし、CPMに対する重量比で、これを超えるAP又はCFを含有する製品では誤差が大きくなり、本法を用いての、CPM中のMAとCPの同時定量はできなかった。Table 1には、これら各製品の成分組成と各成分の含量表示量、並びに本法で得られたMAとCPの定量値を、CPM表示量に対して得られた測定値の含有率(%)で示した。A—D社製剤中のMAとCPの測定含有率はほぼ一致した値を示した。また、錠剤Aを除く製品のCPM含量もCPM表示値とほぼ同じ値を示した。しかし、E社のシロップ剤では、CP量としては表示値と一致するにもかかわらず、MAのピークが得られず (Fig. 3E), MAは定量できなかった。これは同時定量分析により初めて得られた知見で、保存中にMAが変化を受けた可能性もあり興味深い。

謝辞 実験に協力して下さいました浅川綾子さんに感謝致します。

引用文献

- 1) Eckhart C. G., McCorkle T., "Analytical Profiles of Drug Substances," Vol. 7, ed. by Florey K., Academic Press, New York, 1978, p. 43.

- 2) 尾西良一, 森田泰輔, 川村邦夫, 薬誌, **90**, 46 (1970).
- 3) Al-Kaysi H. N., Salem M. S., *Anal. Lett.*, **19**, 915 (1986).
- 4) Tan H. S. I., Salvador G. C., *Anal. Chim. Acta*, **188**, 295 (1986).
- 5) Murtha J. L., Julian T. N., Radebaugh G. W., *J. Pharm. Sci.*, **77**, 715 (1988).
- 6) Leung C.-P., Law C.-K., *Analyst*, **114**, 241 (1989).
- 7) 服部忠雄, 鷺尾幸夫, 神谷則賢, 伊藤剛正, 井上正秀, 薬誌, **99**, 537 (1979).
- 8) Massart D. L., Detaevernier M. R., *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 139 (1980).
- 9) Koziol T. R., Jacob J. T., Achari R. G., *J. Pharm. Sci.*, **68**, 1135 (1979).
- 10) Greco G. T., *Drug Devel. Indust. Pharm.*, **10**, 19 (1984).
- 11) Lau O. W., Chan K., Lau Y. K., Wong W. C., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **7**, 725 (1989).
- 12) Thomas B. R., Fang X. G., Shen P., Ghodbane S., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **12**, 85 (1994).
- 13) Yamato S., Nakajima M., Shimada K., *J. Chromatogr. A*, **731**, 346 (1996).