

ノ ー ト

***o*-スルホフェニルフルオロン-モリブデン(VI) との三元錯体の生成
反応に基づくクロルプロマジン及びその関連薬物の吸光光度定量**山崎智香子^{®1}, 須崎菜穂子¹, 中尾 昌弘¹, 神野伸一郎¹,
山口 敬子¹, 藤田 芳一¹

1 緒 言

クロルプロマジン (CPZ) は, フェノチアジン誘導体に分類される向精神薬で, ドーパミン受容体をはじめ, 様々な受容体に対する遮断作用があり, 統合失調症の陽性症状に対する改善作用がある. しかしながら, 黒質-線条体ドーパミン系神経も抑制するので, パーキンソン病様症状が比較的高頻度に現れる. したがって, CPZ の定量は, 投与量と薬効の関係及び重篤な副作用発現の把握のため非常に重要である. 現在, CPZ の定量法としては, 日本薬局方での電位差滴定をはじめとする滴定分析法¹⁾²⁾, 吸光光度法^{3)~6)}, 蛍光光度法^{7)~11)}など種々の分析法が報告されているが, これらの方法は, 定量感度や操作等の面で種々の欠点が報告¹²⁾されている.

一方, 分析化学の分野では, [色素-金属-被分析物質] の三元錯体の生成反応を利用する分析法が, 単に色素のみ, あるいは金属イオンのみとの二元錯体の生成反応を用いる方法に比べ, 感度, 選択性, 簡便性などの面で非常に優れていることが認められており, 著者らも本法を利用したタンパク質, 医薬品などの生体機能関連化合物の新しい定量法^{13)~21)}を種々報告している. 今回, 色素として, その優位性を認めている¹⁵⁾¹⁶⁾キサントン系の *o*-スルホフェニルフルオロン (SPF) と, 金属イオンとしてモリブデン (VI) [Mo(VI)] を併用する三元錯体の生成反応法による簡便, 高感度で実用的な CPZ 及びその関連化合物の吸光光度定量法の開発を目的として検討した.

2 実 験

2.1 試 薬

2.1.1 SPF の合成 文献記載²²⁾の方法に従って, *p*-ベンゾキノンと無水酢酸より生成した 1,2,4-ベンゼントリオールトリアセテートと *o*-ベンズアルデヒドスルホン酸をモル比 2:1 の割合で混合し, 硫酸を縮合剤として適量加え, 沸騰水浴中, 還流させながら混液が黒茶色となる

まで加温反応した後, 2 週間程度静置し, 沈殿した粗 SPF を濾取した. 次いでエタノール:精製水 (1:1) に溶解した後, 数日間冷暗所に放置した. 最後に濾取した赤茶色沈殿物を十分水洗し, SPF を得た. 得られた SPF を恒量になるまで十分減圧乾燥し, 精製 SPF として使用した. ¹H 核磁気共鳴法 (NMR) (DMSO-*d*₆, 500 MHz) { δ 6.551 (2H, s), δ 7.142 (2H, s), δ 7.193 (1H, *dd*, *J* = 7.6, 1.1), δ 7.575 (1H, *td*, *J* = 7.6, 1.1), δ 7.642 (1H, *td*, *J* = 7.8, 1.4), δ 8.013 (1H, *dd*, *J* = 7.8, 1.4)}, MS [二次イオン質量分析 (SIMS): *m/z* = 401]. SPF の構造²³⁾を Fig. 1 に示す.

2.1.2 試薬の調製 CPZ 溶液: 塩酸クロルプロマジン (Sigma 製) 一定量に精製水を加えて, 1.0×10^{-3} mol dm⁻³ 溶液を調製し, 褐色瓶に入れ, 冷所保存した. 本溶液を用時, 精製水で 10 倍希釈し, 1.0×10^{-4} mol dm⁻³ 溶液としてから使用した. その他の医薬品も, 一定量を精製水もしくはメタノールで溶解し, 1.0×10^{-3} mol dm⁻³ を調製した. また, 一部の医薬品については, 少量の 1.0 mol dm⁻³ 塩酸で溶解した後, 精製水で 1.0×10^{-3} mol dm⁻³ 溶液とした.

SPF 溶液: 合成した SPF 40 mg を精密にはかり, 1.0 mol dm⁻³ 水酸化ナトリウム水溶液 1 ml で溶かし, 次いで 1.0 mol dm⁻³ 塩酸で中和した後, メタノールで全量を 100 ml の 1.0×10^{-3} mol dm⁻³ SPF 溶液として調製し, 褐色瓶に入れ保存した.

Mo(VI) 溶液: 和光純薬製の原子吸光分析用モリブデン

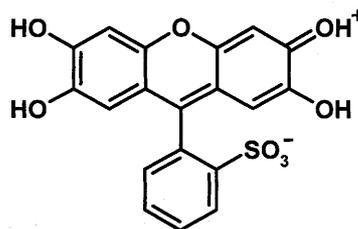


Fig. 1 Structure of SPF

¹大阪薬科大学: 569-1094 大阪府高槻市奈佐原 4-20-1

標準液 (1000 ppm) を適宜希釈し, $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 溶液とした。

Tween 80 溶液: Tween 80 (Tween 80; polyoxyethylene sorbitan monooleate MP biomedical, LLC 製) 1.0 g をはかり, 精製水を加えよく混和した後, 全量 100 ml の 1.0% Tween 80 溶液を調製した。本液を孔径 0.30 μm のメンブランフィルターを用いて吸引濾過し, 得られた濾液を使用した。

緩衝液: 0.2 mol dm^{-3} 塩酸及び 0.2 mol dm^{-3} 酢酸ナトリウム水溶液を pH メーターで測定しながら適宜混合し, pH 2.0 の緩衝液として用いた (Walpole 緩衝液)。

その他の試薬は市販特級品を精製せずそのまま用いた。また, 本実験ではミリポア製 Academic A 10 型 MilliQ による精製水を使用した。

2.2 装置

吸収スペクトル及び吸光度の測定: 島津製 UV-160 型分光光度計を用い, セルは層長 10 mm の石英製セルを使用した。

pH の測定: 堀場製 F-11 型ガラス複合電極 pH メーターを用いた。

2.3 CPZ の標準定量操作

10 ml のメスフラスコに, 1.0% Tween 80 溶液 2.0 ml を加え, 次いで $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ Mo(VI) 溶液 0.5 ml, 0.2 mol dm^{-3} Walpole 緩衝液 (pH 2.0) 2.5 ml, $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ SPF 溶液 0.6 ml, 次いで $0.2 \sim 7.0 \mu\text{g/ml}$ の CPZ 溶液を加え, 精製水で全量 10 ml とする。この溶液をかくはんしながら試験管に移し, 室温で 30 分間静置後, CPZ のみを除いて同様に処理して得た試薬空試験液を対照に 525 nm での吸光度を測定し, あらかじめ作成して得た検量線より CPZ 量を求める。

3 結果及び考察

3.1 定量条件の設定

3.1.1 液性の影響 本呈色反応に対する液性の影響を検討したところ, Walpole 緩衝液を全量 2.5 ml 加えて最終的に pH 2.6~2.9 に液性調整したとき, 525 nm における吸光度は一定値を示した。

3.1.2 界面活性剤の影響 生成する呈色体は, 分散剤が共存しないときにはしばらく静置すると沈殿する。したがって, 呈色体の水溶性化, 安定化及び定量感度の上昇を目的として, 錯体生成反応に関与しないと考えられる非イオン性 (Tween 80, Tween 20, Brij-35, Triton X-100, ポリビニルアルコール, アラビアゴム末, メチルセルロース), 並びに参考までに陰イオン性 (ラウリル硫酸ナトリウム, エアロゾール OT), 陽イオン性 (塩化トリメチル

ステアリルアンモニウム, 塩化セチルトリメチルアンモニウム) 界面活性剤を検討したところ, 非イオン性の Tween 80 液を用いたとき, 界面活性剤を用いない場合と比べ約 10 倍の感度を示し, 更には, しばらく静置しても沈殿は全く生じなかった。Tween 80 液量としては, 全量 10 ml に対し 1.0% Tween 80 液 2.0 ml 用いることにした。

3.1.3 金属イオンの種類及び濃度の影響 三元錯体を生成する金属イオンを検討したところ, インジウム(III), イットリウム(III), アルミニウム(III), 鉄(III), ランタン(III), ガリウム(III), チタン(IV), ジルコニウム(IV), ハフニウム(IV), パナジウム(V), ニオブ(V), タンタル(V), モリブデン(VI), タングステン(VI) のうち, チタン(IV) 及びモリブデン(VI) が鮮明な呈色体を生成するが, 後者のほうがより有効であった。また, 全量 10 ml に対し, $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ Mo(VI) を 0.5 ml 加えたとき, 最も高い吸光度を示した。

3.1.4 SPF 濃度の影響 Mo(VI) 一定量 ($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 0.5 ml) に対し, $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ SPF 溶液 0.6 ml 加えたとき, 525 nm における吸光度はほぼ最大値を示した。

3.1.5 反応時間及び温度の影響 2.3 の操作で, 室温での静置時間を 10~180 分と変化させ, 反応時間の検討を行ったところ, 30 分間静置するとき最も高い吸光度を示した。一方, 40°C で 20 分間加温後, 5 分間水冷して得た吸光度は, 室温静置後の吸光度よりも低い値を示した。したがって, 本呈色反応は, 加温により感度が低下することが認められ, 室温で静置する方法を選択した。更に, 試薬添加順序を種々検討したところ, 2.3 で述べた順に試薬を添加したとき, すなわち, Tween 80 液 \rightarrow Mo(VI) 液 \rightarrow 緩衝液 \rightarrow SPF 溶液 \rightarrow CPZ 溶液の順に添加したとき, 最も良好な結果を得た。

3.2 吸収スペクトル及び検量線の作成

2.3 の定量操作に従って CPZ の吸収スペクトル (Fig. 2) 及び検量線を作成したところ, $0.2 \sim 7.0 \mu\text{g/ml}$ の CPZ 濃度において良好な直線を得ることができた。本操作法による定量感度は, モル吸光係数 (ϵ) が $4.6 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を示し, 比較的高感度であった。また, 相対標準偏差 (RSD) は, 2.4% ($n = 6$, $3.6 \mu\text{g/ml}$ CPZ) であり, 再現性にも優れていた。また, CPZ 以外の CPZ 関連薬物の反応性を検討した結果を Table 1 に示す。本法では, CPZ 以外のフェノチアジン誘導体, 更には三環系抗うつ病薬, ベンゾジアゼピン系抗不安薬も CPZ とほぼ同感度で分析することができ, 十分定量可能であると考えられる。

3.3 共存物質の影響

本操作法における共存物質の影響を CPZ 3.6 $\mu\text{g/ml}$ に対して, 共存物質を CPZ のモル比で数倍~100 倍の範囲で添加して検討した (Table 2). 金属イオンとしては, マグネシウム(II), 亜鉛(II), 銅(II), カルシウム(II) などについてはほとんど妨害せず, 鉄(III) は CPZ と等量共存するとき, 負の誤差を示した. フッ化物イオン, 塩化物イオン, 臭化物イオン, ヨウ化物イオン, リン酸イオン, 硫酸イオン, チオシアン酸イオンなどの陰イオンの共存は, 妨害が極めて少ないことを認めた. また, 有機酸については, マレイン酸, アスコルビン酸共存による影響は少なく, クエン酸, シュウ酸, サリチル酸など Mo(VI) と錯生成しやすいと考えられるものについては, 少量共存でも妨害することが認められた. 更に生体中に多量に存在するグリシ

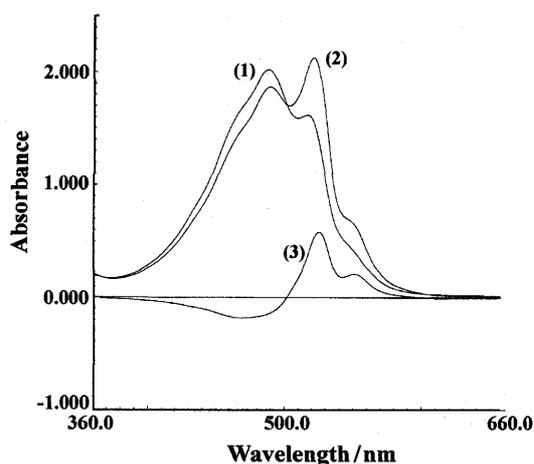


Fig. 2 Absorption spectra obtained by the standard procedure

CPZ added: 36 μg ; Mo(VI): $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; SPF: $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; 0.2% Tween 80; pH 2.0. (1): SPF-Mo(VI) against water; (2): SPF-Mo(VI)-CPZ against water; (3): SPF-Mo(VI)-CPZ against SPF-Mo(VI)

ン, 尿素, グルコースなどは, 多量共存でも影響を与えなかった. しかしながら, ヒト血清アルブミン (HSA: human serum albumin) は, 多量共存では妨害が認められた. 共存薬物としては抗ヒスタミン剤であるジフェンヒドラミンなどは, 多量共存するとき正の誤差を示すが, 標準添加法を用いることにより, その影響を低減させることができた.

Table 2 Effect of foreign substances

Substances	Molar ratio (substance/CPZ)	Recovery, %
None	—	100.0
Mg(II)	10	100.0
Zn(II)	10	100.0
Cu(II)	10	100.0
Ca(II)	10	100.0
Fe(III)	1	94.0
NaF	10	100.0
NaCl	100	100.0
NH ₄ Cl	100	100.0
NaBr	100	100.0
NaI	100	100.0
KH ₂ PO ₄	10	100.0
Na ₂ SO ₄	10	100.0
KSCN	100	100.0
Ascorbic acid	100	100.0
Maleic acid	10	100.0
Citric acid	1	100.0
Oxalic acid	1/10	100.0
Salicylic acid	1	100.0
Thiamine	5	100.0
Pyridoxine	10	100.0
Diphenhydramine	2	100.0
Glycine	10	100.0
Urea	100	100.0
Glucose	100	100.0
EDTA	10	84.0
HSA	(75 $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$)	122.0

CPZ added, 3.6 $\mu\text{g/ml}$; Mo(VI): $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; SPF: $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; 0.2% Tween 80; pH 2.0; Reference: Mo(VI)-SPF solutions

Table 1 Sensitivities of CPZ and its related drugs

Drug	Derivatives	Molar absorptivity ^{a)} / $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	RSD ^{b)} ($n = 6$), %
CPZ	Phenothiazines	4.6×10^4	2.40
Promethazine	Phenothiazines	4.3×10^4	— ^{c)}
Thioridazine	Phenothiazines	5.2×10^4	4.75
Fluphenazine	Phenothiazines	1.4×10^5	1.14
Levomepromazine	Phenothiazines	3.6×10^4	— ^{c)}
Profenamine	Phenothiazines	3.8×10^4	— ^{c)}
Amoxapine	Iminodibenzyls	2.5×10^4	— ^{c)}
Imipramine	Iminodibenzyls	3.5×10^4	— ^{c)}
Clomipramine	Iminodibenzyls	4.5×10^4	— ^{c)}
Clotiazepam	Benzodiazepines	7.8×10^3	— ^{c)}

Mo(VI): $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; SPF: $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; 0.2% Tween 80; pH 2.0; Reference: Mo(VI)-SPF solutions. a) Molar absorptivity was calculated by the calibration curve. b) RSD: relative standard deviation. c) Undetermined

3・4 錯体の組成

本呈色体の組成を、連続変化法、モル比法で検討した。まず、SPF:Mo(VI)の組成比について検討したところ、CPZ共存、非共存にかかわらずFig. 3に示すように、SPF:Mo(VI) = 1:1の結果が得られた。また、[SPF-Mo(VI)]:CPZの組成比を検討したところ、1:1の結果が推定された。より詳細な検討が必要であるが本反応で生成する呈色体は、[SPF-Mo(VI)-CPZ] = [1:1:1]の三元錯体が推定された。

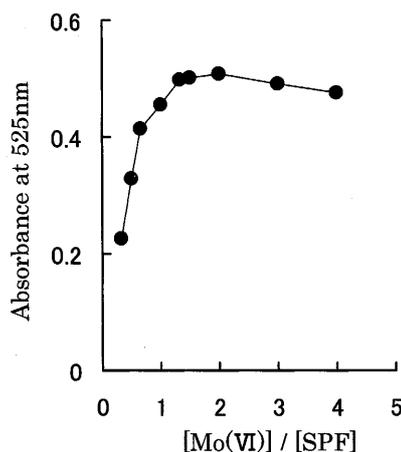


Fig. 3 Absorbance of the solution obtained by molar ratio method

SPF: 1.0×10^{-5} mol dm⁻³; Mo(VI): 1.0×10^{-4} mol dm⁻³ × x ml/10 ml; CPZ: 1.0×10^{-4} mol dm⁻³; 0.2% Tween 80; pH 2.0; SPF-Mo(VI)-CPZ against SPF-CPZ

3・5 製剤中の薬物分析

本定量法を市販製剤（注射剤、錠剤）中の薬物分析に応用したところ、Table 3に示すような結果を得た。これらの製剤は、緩衝剤、安定剤、賦形剤などの添加物を含有するが、前処理操作を行わなくても十分な測定値及び回収率が得られ、製剤中の薬物の日常分析法として十分応用できることが分かった。

（2005年日本分析化学会第54年会
（名古屋）、2006年第67回分析化学
討論会（秋田）において一部発表）

文 献

- 1) M. P. San Andres, D. Sililia, S. Rubio, D. Perez-Bendito: *J. Pharm. Sci.*, **87**, 821 (1998).
- 2) N. A. Zakhari, K. A. Kovar: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 620 (1986).
- 3) J. M. Garciafraga, A. I. Jimenez Abizanda, F. Jimenez Moreno, F. Arias: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **9**, 109 (1991).
- 4) H. Trabelis, F. Raouafi, M. Limam, K. Bouzouita: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **29**, 239 (2002).
- 5) J. Karpinska: *Anal. Lett.*, **33**, 1555 (2000).
- 6) K. Kitamura, T. Goto, T. Kitade: *Talanta*, **46**, 1433 (1998).
- 7) H. L. Rau, A. R. Aroor, P. G. Rao: *Ind. J. Pharm. Sci.*, **53**, 31 (1991).
- 8) F. A. Mohamed: *Anal. Lett.*, **28**, 2491 (1995).
- 9) J. Martinez-catalayud, C. Gomez-Benito: *Anal. Chim. Acta*, **256**, 105 (1992).
- 10) D. Chen, A. Rios, M. D. Luque-de Castro, M. Valcarcel: *Talanta*, **38**, 1227 (1991).
- 11) M. C. Gutierrez, A. Gomez-Hens, D. Perez-Bendito: *Anal. Lett.*, **20**, 1847 (1987).
- 12) F. A. Mohamed, H. A. Mohamed, S. A. Hussein, S. A. Ahmed: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39**, 139 (2005).
- 13) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **32**, E379 (1983).
- 14) Y. Fujita: *ICMR Annals*, **20**, 237 (2000).
- 15) Y. Fujita, I. Mori, T. Matsuo: *Anal. Sci.*, **13**, 513 (1997).
- 16) T. Yamaguchi, E. Amano, S. Kamino, S. Umehara, C. Yanaihara, Y. Fujita: *Anal. Sci.*, **21**, 1237 (2005).
- 17) M. Nakao, C. Yamazaki, H. Tominaga, T. Yamaguchi, Y. Fujita: *Anal. Sci.*, **22**, 313 (2006).
- 18) H. Kadobayashi, T. Nakamori, T. Yamaguchi, Y. Fujita: *Chem. Lett.*, **33**, 610 (2004).
- 19) 山口敬子, 村瀬裕成, 森 逸男, 藤田芳一: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **50**, 563 (2001).
- 20) I. Mori, K. Takasaki, Y. Fujita, T. Matsuo: *Talanta*, **47**, 631 (1998).
- 21) 藤田芳一, 森 逸男, 豊田美奈子, 田口一彦: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **42**, T1 (1993).
- 22) H. Sano: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **31**, 974 (1958).
- 23) S. Kamino, M. Doi, T. Yamaguchi, H. Tominaga, E. Amano, S. Umehara, M. Naito, C. Yamazaki, Y. Fujita: *Anal. Sci.*, **22**, x35 (2006).

Table 3 Application of this method to determination of phenothiazines (content) in pharmaceutical preparations

Sample ^{a)}	Content/mg		RSD ^{b)} (n = 3), %	Recovery ^{c)} (n = 3), %
	Nominal amount	Determined amount		
A (CPZ)	10	10.4	2.7	101.8
B (Fluphenazine)	0.5	0.53	1.4	99.7
C (Thioridazine)	10	9.4	3.9	97.9

a) Sample A, CPZ injection (10 mg/2 ml in 1 ampule); Sample B, Fluphenazine tablet; Sample C, Thioridazine tablet. b) RSD: relative standard deviation. c) CPZ added, 15.0 µg; Fluphenazine added 12.8 µg; Thioridazine added 30.0 µg

Spectrophotometric Determination of Chlorpromazine and Its Related Drugs by Ternary Complex Formation with *o*-Sulfophenylfluorone-Molybdenum(VI)

Chikako YAMAZAKI¹, Naoko SUZAKI¹, Masahiro NAKAO¹, Shinichiro KAMINO¹,
Takako YAMAGUCHI¹ and Yoshikazu FUJITA¹

¹ Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki-shi, Osaka 569-1094

(Received 14 April 2006, Accepted 19 June 2006)

A novel spectrophotometric method was established for the determination of chlorpromazine (CPZ) and its related drugs. The method is based on ternary complex formation among *o*-sulfophenylfluorone, molybdenum(VI) and CPZ. In the determination of CPZ, Beer's law is obeyed in the range of 0.2~7.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The effective molar absorptivity at 525 nm and the relative standard deviation were $4.6 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and 2.4% ($n = 6$), respectively. The method was successfully applied to assays of CPZ and its related drugs in pharmaceutical preparations. The proposed method, requiring no solvent extraction, should be useful for a simple and sensitive determination of CPZ and its related drugs.

Keywords : chlorpromazine; chlorpromazine related drugs; spectrophotometry; *o*-sulfophenylfluorone-molybdenum(VI); ternary complex formation.